

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN

KIEL

B. SCHARRER

NEW YORK

J. SEILER

ZÜRICH

54. BAND, 3. HEFT

MIT 70 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 24. MAI 1961)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1961

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von R. Goldschmidt und W. von Möllendorff. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von W. von Möllendorff und J. Seiler. Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A. Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. (Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von Max Schultze; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von v. La Valette St. George, W. Waldeyer; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von W. Roux, H. Braus, H. Spemann.)

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma“, Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie“ weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

54. Band

Inhaltsverzeichnis

3. Heft
Seite

LAWS, D. F., Hypothalamic neurosecretion in the refractory and post-refractory periods and its relationship to the rate of photoperiodically induced testicular growth in <i>Zonotrichia leucophrys gambelii</i> . With 14 Figures in the Text	275
OKSCHE, A., Der histochemisch nachweisbare Glykogenaufbau und -abbau in den Astrocyten und Ependymzellen als Beispiel einer funktionsabhängigen Stoffwechselaktivität der Neuroglia. Mit 14 Textabbildungen	307
RÖHLICH, P., und L. J. TÖRÖK, Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Auges von Planarien. Mit 16 Textabbildungen	362
PETRY, G., L. OVERBECK und W. VOGEL, Vergleichende elektronen- und lichtmikroskopische Untersuchungen am Vaginalepithel in der Schwangerschaft. Mit 13 Textabbildungen	382
HOFFMEISTER, H., Morphologische Beobachtungen an erschöpften indirekten Flugmuskeln der Wespe. Mit 13 Textabbildungen	402

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift bezieht auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Laboratories of Zoophysiology, Department of Zoology, Washington State University,
Pullman, U.S.A.

HYPOTHALAMIC NEUROSECRETION IN THE REFRACTORY AND
POST-REFRACTORY PERIODS AND ITS RELATIONSHIP TO THE RATE
OF PHOTOPERIODICALLY INDUCED TESTICULAR GROWTH
IN *ZONOTRICHIA LEUCOPHRYS GAMBELII**

By

DONALD F. LAWS

With 14 Figures in the Text

(Received December 24th, 1960)

Introduction

It is now well known that the characteristic vernal testicular development of many temperate-zone species of birds is primarily a photoperiodic phenomenon, being evoked by the longer days of spring. Our knowledge of this phenomenon has been reviewed by FARNER (1958, 1959) and OKSCHE *et al.* (1959). It was however noted many years ago (BISSENETTE 1930a, b) that the testes of wild birds may begin to decrease in size while natural daily photoperiods are still long and may return eventually to an inactive condition despite the long days of late summer. RILEY (1936) first demonstrated in the house sparrow (*Passer domesticus*) that such inactive testes could not be made to grow by subjecting birds to long photoperiods. The time in late summer and early fall during which a photoperiodic testicular response to light cannot be obtained has been termed the refractory period. This has been demonstrated experimentally in a number of temperate-zone birds (see Table 2 in FARNER 1960) and has been the object of considerable study (see reviews cited above; also WOLFSON 1959a, b; LAWS 1960). It has been demonstrated that the refractory period may be prolonged, apparently indefinitely, by use of long daily photoperiods, and that it may be shortened considerably by use of short daily photoperiods. Under natural conditions, therefore, refractoriness must be maintained by the long days of late summer and early fall, and eliminated by the shorter days of late fall and winter so that a bird becomes capable again of responding to long daily photoperiods before the ensuing spring. Since the testes of refractory male birds can be made to grow by injecting gonadotropic hormones (CLARK *et al.* 1937; BENOIT *et al.*

* These investigations were supported by funds provided for medical and biological research by the State of Washington Initiative Measure No. 171, through a grant to Professor DONALD S. FARNER, and by a research grant (8-1353) from the National Institute of Health to Professor FARNER. Much of the research was accomplished while the author held the Porter Fellowship of the American Physiological Society. The author gratefully acknowledges the advice and assistance of Professor FARNER and of Dr. ANDREAS OKSCHE of the Anatomisches Institut der Universität Marburg a.d. Lahn. He is also grateful to Dr. CONRAD DONOVAN for performance of castrations. The photographs were prepared by the Photography Section, Health Sciences Division, University of Washington, Seattle.

1950; MILLER 1949; SCHILDMACHER 1939; VAUGIEN 1954, 1955, 1956; LOFTS and MARSHALL 1958) it appears that release of gonadotropins from the anterior pituitary is prevented, or reduced to an ineffective level, during refractoriness. One would therefore expect the refractory period to be a favorable time for studying the hypothalamic mechanism which controls release of gonadotropins from the anterior pituitary. The experiments of BENOIT and his associates (ASSENMACHER 1958; BENOIT and ASSENMACHER 1955, 1959) indicate that this hypothalamic control mechanism involves elements of the neurosecretory system.

The hypothalamic neurosecretory system of *Zonotrichia leucophrys gambelii* has been described in considerable detail in earlier publications from this laboratory (OKSCHE *et al.* 1959; OKSCHE 1960; KOBAYASHI and FARNER 1960). It has been shown that changes in the level of neurosecretory material under experimental and natural conditions are closely correlated with the gonadotropic activity of the adenohypophysis (OKSCHE *et al.* 1959). In non-refractory birds changed to 20-hour daily photoperiods and showing rapid testicular growth, there was a decrease in the amount of neurosecretory substance in the hypothalamus, particularly at the level of the median eminence. In aviary birds held outdoors under natural light, the testes reached maximal size in early June, and regressed rapidly to resting condition towards the end of the month as the birds entered the refractory period. At the time of maximal growth there was an almost complete absence of stainable neurosecretory material in the median eminence and elsewhere in the system, a condition very similar to that of the 20-hour experimental birds. Then between 3 June and 31 August, during the period in which the birds became refractory, there was a rapid accumulation of neurosecretory material in the median eminence and in the cells of the supraoptic nucleus, and a decrease of cell size in the latter region. It has been shown also that the acid-phosphatase activity of the median eminence of *Zonotrichia leucophrys gambelii* increases significantly in non-refractory birds subjected to 20-hour photoperiods (KOBAYASHI and FARNER 1960); this increase did not occur in refractory birds.

In the investigations described herein, an attempt is made to characterize more precisely the changes which occur in the neurosecretory system of *Zonotrichia leucophrys gambelii* during the onset and disappearance of refractoriness. A study has also been made of seasonal changes in the sensitivity of the photoperiodic response mechanism as indicated by testicular growth rate in response to long daily photoperiods. This serves to characterize further the post-refractory period and to contribute to our understanding of hypothalamic control of the gonadotropic activity of the adenohypophysis.

Materials and Methods

The methods of capture and maintenance and also the experimental advantages of the white-crowned Sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*, have been described previously by OKSCHE *et al.* (1959). Information on the biology of the species is given by BLANCHARD (1941) and BLANCHARD and ERIKSON (1949). Most of the pertinent experimental papers are listed by LAWS (1960).

We have available currently some 450 hypothalami of *Zonotrichia leucophrys gambelii*, sectioned serially, and a considerable number of these have been studied in this investigation. In order to characterize the condition of the neurosecretory system before, during and after

the refractory periods, a detailed study has been made of hypothalami from 33 birds, 14 of which were maintained prior to killing in outdoor aviaries under natural conditions of light and temperature (Table 1). The other 19 were captured and killed in the field (Table 2). Killing, dissection, and fixation were in all cases as described previously (OKSCHE *et al.* 1959). Tissues were embedded in paraffin via methyl benzoate and benzene, and sectioned at 10 μ . Sections were separated into two series, one being stained with aldehyde-fuchsin (GOMORI-HALMI-DAWSON), the other with toluidine blue (ROMEIS 1948) for eventual karyometric studies according to the method of HERTL (1955). Regarding aldehyde-fuchsin, it does not appear to have been noted in the literature that very small traces of bisulfite reducer, when carried over into the staining mixture, quickly lead to nonspecific results. This appears to be responsible in large measure for the capricious reputation of the stain. We therefore have adopted the practice of washing sections for ten to fifteen minutes in several changes of distilled water, before transferring from bisulfite reducer to aldehyde-fuchsin. With this precaution, and assuming that fresh oxidizer and properly ripened stain have been used, there is no nonspecific coloration whatsoever. One hundred milliliters of dilute aldehyde-fuchsin will stain at least a hundred slides without visible deterioration.

In studying the condition of neurosecretory cells observations were recorded on size of nucleus, size of nucleolus, and amount of cytoplasm. Neurosecretory material within the cells occurs variously in the form of large or small droplets, or as a finely dispersed haze which sometimes forms a caplike accumulation around the nucleus. In studying a division of neurosecretory cells, therefore, the form and distribution of the neurosecretory material were also recorded. Some variations were also noted in the staining properties of nucleus and cytoplasm, and in the distinctness of the nucleus within the cell. When these variations were of a regular seasonal nature they were recorded.

Since considerable variability was encountered in the neurosecretory state, quantitative comparisons between sections (*e.g.* droplets versus finely divided matter, or large droplets versus much smaller droplets) presented some difficulty. In studying a neurosecretory area we finally adopted the practice of comparing sections from different birds on two microscopes which were set up side by side with identical lighting and magnification. Every bird in an experimental series was compared in this way with every other bird, and a judgment was made as to which contained the greater amount of neurosecretory material. When the results were tabulated, further comparisons enabled any doubtful judgments to be recognized and corrected; from the tabulation of such observations, indices representing the density of neurosecretion were constructed. Such indices are employed in Tables 1 and 2. It must be emphasized that they have their highest accuracy within columns, and can be used only very approximately to compare densities of neurosecretory material between different parts of the neurosecretory system (*e.g.* median eminence and supraoptic nucleus). This index has been employed merely to give a semi-quantitative expression of neurosecretory activity; it cannot be closely compared with that used in our previous publication (OKSCHE *et al.* 1959) which depends upon the state of neurosecretory material within the cell, as well as its quantity. An approximate comparison may be made however by comparing the tables and corresponding figures given here with those of OKSCHE *et al.* (1959).

Birds intended for photoperiodic experiments were maintained in outdoor aviaries until the end of January. Since under natural conditions the testes begin to enlarge detectably at the beginning of February, aviary birds were brought indoors at this time and maintained in large flight cages on 8-hour photoperiods until they were required for experiments. Essentially, therefore, birds used in photoperiodic experiments have been subjected to short days from the beginning of the previous winter.

The procedures and conditions for the photoperiodic experiments were as described earlier by FARNER and WILSON (1957). The rates of testicular growth were calculated essentially also according to FARNER and WILSON (1957). As shown in this investigation the logarithm of testicular weight, in birds subjected to stimulatory daily photoperiods of constant duration, is approximately a linear function of time until a combined testicular weight of the order of 200 mg is attained. A straight regression line may be fitted to such data by standard methods (MOOD 1950) and the slope of this line (k , of FARNER and WILSON 1957) may be used as a measure of the rate of testicular growth. In assessing the significance of variations in k , only t -tests of standard form have been necessary.

Results

Further Observations on the Morphology of the Neurosecretory System of Zonotrichia leucophrys gambelii

As noted previously (OKSCHE *et al.* 1959) the neurosecretory system of *Zonotrichia leucophrys gambelii* contains much more aldehyde-fuchsin-positive material during the annual refractory period than it does at other seasons;



Fig. 1a-f. Transverse sections (a anterior, f posterior) through the hypothalamus of a refractory male white-crowned sparrow, showing the different divisions of neurosecretory cells and the directions of the tracts, as discussed in the text. All diagrams represent the same bird, and were prepared from microprojector drawings of aldehyde-fuchsin preparations. $\times 9$. a.c. anterior commissure, c. optic chiasma, c.h. cerebral hemisphere, d. diencephalon, 3v. third ventricle, 1 through 9, divisions of neurosecretory cells. Distribution of neurosecretory cells is indicated by circular black spots. The smaller dots and dotted lines associated with these represent neurosecretory axons. Drawn from No. 54187429, killed 25 June 1959

consequently cells and axons are much more prominent during this period. It therefore has been possible in this investigation to describe a number of groups of neurosecretory cells and some neurosecretory tracts not included in the previous description. Since the primary function of this paper is to characterize the changes

in the neurosecretory system during the onset and disappearance of refractoriness, it is sufficient to define the additional divisions of the neurosecretory nuclei by numbers. A more detailed description of the morphology and relationships of the system is in preparation (OKSCHE and FARNER, unpublished).

The camera lucida drawings of Fig. 1 show the distribution of neurosecretory cells within the hypothalamus of a refractory male bird. Numbers 1 through 6 have their previous significance (OKSCHE *et al.* 1959); 7 and 8 apparently represent additional divisions of the paraventricular nucleus whereas 9 is probably the most posterior division of the supraoptic nucleus. In these last three divisions

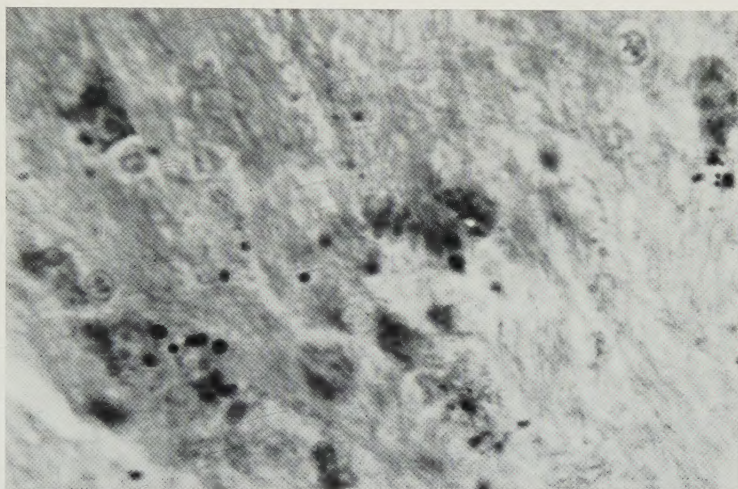


Fig. 2. Lateral neurosecretory cells from division 7, close to the origin of the supraoptic decussation. White-crowned sparrow No. 54187430 ♂. Refractory bird from outdoor aviary, 2 September 1959. The cells, which are normally small, are hence at their minimal size (see text). Aldehyde-fuchsin. $\times 1015$

the neurosecretory cells are scattered, and distinctly smaller than those of divisions 1, 2 and 3, but are of typical form (Fig. 2). The cytoplasm frequently contains finely dispersed aldehyde-fuchsin-positive material, which may be resolvable into fine droplets under oil immersion ($\times 1700$). Larger droplets often occur, sometimes in considerable numbers, and may extend into the axons. In the preparations it is possible to observe all the typical cytological stages which have been described previously (OKSCHE *et al.* 1959) and which appear to represent different stages of neurosecretory activity. The cells of division 7 frequently have smaller nuclei and less cytoplasm than those of divisions 8 and 9; this may reflect functional differences or differences in activity. An examination of sections from experiments on osmotic stress has shown that the cells of divisions 7, 8 and 9 respond in the same way as has been noted for divisions 1 through 6 (OKSCHE *et al.* 1959). The difference in size between the cells of division 7 and those nearby still persists under such conditions.

Although neurosecretory cells in the above areas are scattered, cell numbers are comparable to those noted elsewhere. Division 9, for example, extends from the supraoptic nucleus to the posterior margin of the supraoptic decussation, a distance of approximately 1.2 mm. Assuming conservatively that there are

10 cells per 10-micron section it would contain more than 1000 cells, a number of the same order as that indicated by direct counts for the medial paraventricular nucleus (divisions 4 plus 5).

Neurosecretory cells in the general region of divisions 7 and 8 appear to have been observed in the chicken by LEGAIT (1959) and by GRIGNON (1956). It has not been possible, however, to make a precise comparison with the present observations.

Axons from divisions 6, 7 and 8 are particularly distinct in refractory birds, and their general directions are shown in Fig. 1. They may be related in part



Fig. 3. Lateral neurosecretory tract as it descends from the lateral cell areas to the median eminence, dorsal to the fibers of the supraoptic decussation (lower left). The larger dark areas (1) are blood vessels. Male white-crowned sparrow No. 54187429. Refractory aviary bird, killed 25 June 1959. Aldehyde-fuchsin. $\times 544$

to the fibers of unknown origin depicted by WINGSTRAND (1951, Fig. 125, *k* and *i*). The neurosecretory axons pass ventrally close to the supraoptic decussations (Fig. 1) and at the same time increase considerably in number, suggesting that nerve fibers from divisions 1 and 5 may have joined the tract. On the other hand few or no aldehyde-fuchsin-positive axons are visible in the immediate region of divisions 1 to 5, and 9, even when the tracts shown in Fig. 1 are densely stained. This question of whether fibers from divisions 1 to 5 have joined the lower tract, must therefore eventually be settled by the use of silver impregnations. It seems most probable that the more ventral part of the lateral tracts described here (Fig. 1f) represents the major portion of the hypothalamo-hypophysial tract.

The peculiar looping fibers previously described in the ependymal layer of the median eminence require consideration here since they have been observed most distinctly in refractory birds. Fig. 5a shows a longitudinal section through

the tuber cinereum, including the posterior part of the median eminence and anterior portion of the infundibular stem. In the stratum ependymale of both regions numerous looping fibers occur, showing a gradient in aldehyde-fuchsin-positive material with the densest region immediately adjacent to the ventricle. In the stratum fibrosum of the infundibular stem numerous aldehyde-fuchsin-positive glial cells are visible. In processes of these cells which extend towards the ventricle the gradient in Gomori-positive material is opposite to that of the looping fibers of the stratum ependymale, staining being at a maximum in the region of the cell body. No continuity of ependymal loops with glial cells or with neurosecretory axons has ever been observed.

As shown in Fig. 5a the glial cells of the stratum fibrosum possess processes directed towards both the ventricle and the outer surface of the tuber cinereum in the general region of the portal capillaries. Since these cells, together with the looping fibers of the ependymal region, and possibly the ependymal cells themselves form a system linking the ventricle and capillaries, the possibility exists that some sort of transfer of material might be involved. The fact that the aldehyde-fuchsin-positive material in these

structures does not appear to be identical with neurosecretory material, does not necessarily negate such a possibility. The fact that the system is not always selectively stainable with aldehyde-fuchsin indicates that the staining properties do not reflect static structural features.

Ependymal loops, apparently identical with those of the median eminence, may also be visible in the preoptic recess (Fig. 5b), close to the supraoptic nucleus



Fig. 4. Diencephalon of the white-crowned sparrow. Sagittal section slightly lateral to median plane showing spatial relationships of main structures. Prepared from a microprojector drawing. $\times 24$. *a.c.* anterior commissure, *a.l.* adenohypophysis, *b.v.* blood vessel, *c.* chiasma, *c.a.* carotid artery, *cb.* cerebellum, *c.h.* cerebral hemisphere, *l.v.* lateral ventricle, *m.e.* median eminence, *p.* pineal, *pl.ch.* choroid plexus, *tr.* supra-optico-hypophysial tract, *III* third cranial nerve, *3v.* third ventricle, *2, 4, 5* divisions of supraoptic and paraventricular neurosecretory cells. Drawn from No. 27195221 ♂

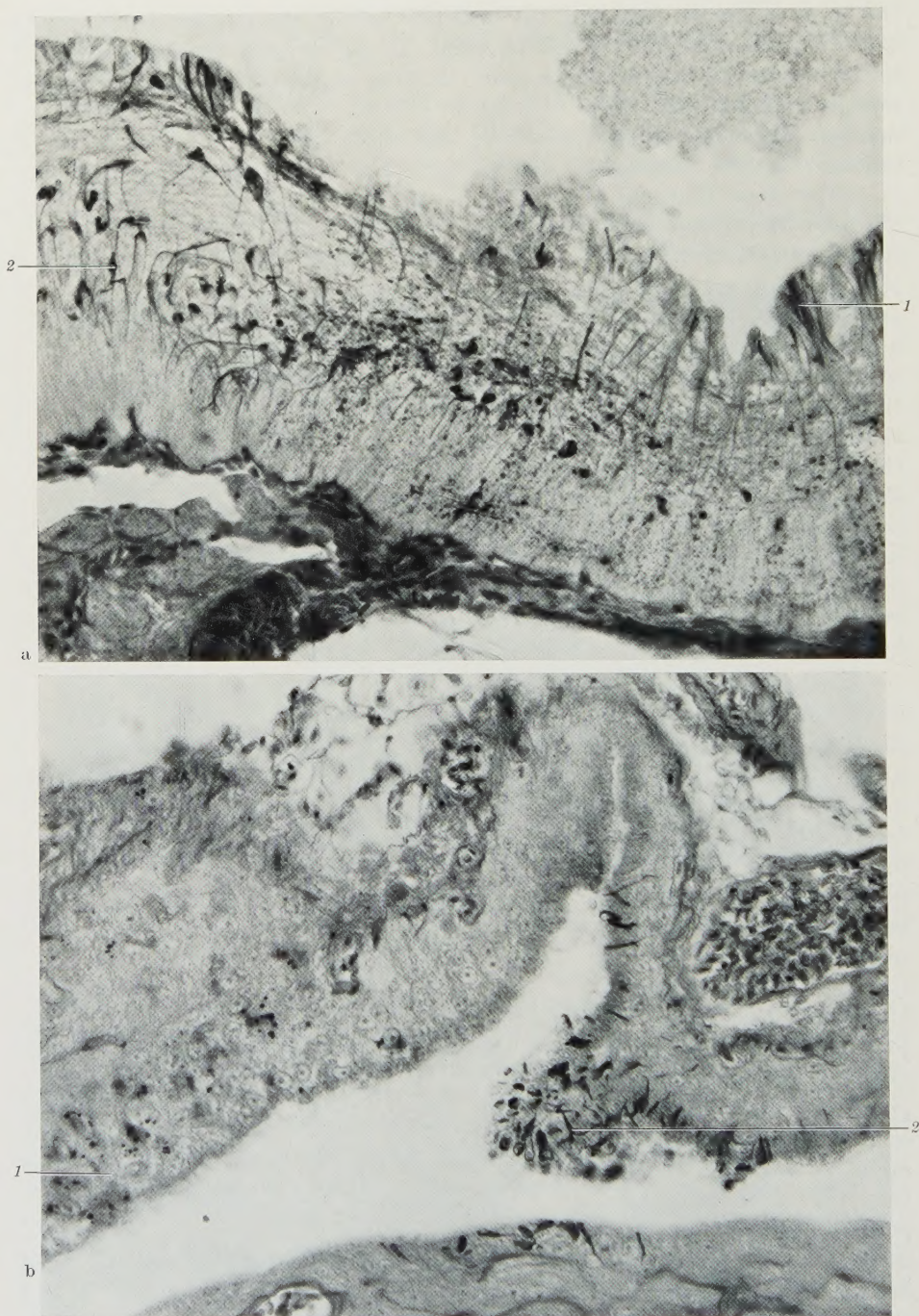


Fig. 5. a Aldehyde-fuchsin-positive ependymal loops in proximity to the hypothalamic neuro-secretory system of the white-crowned sparrow. Sagittal section of tuber cinereum (left) and median eminence (right). 1 ependymal loops, 2 aldehyde-fuchsin-stained glial-cell structures. No. 27 195 221 ♂. $\times 320$. b Transverse section through preoptic recess. 1 cells of supraoptic nucleus (division 2), 2 ependymal loops. No. 27 184 741 ♂. $\times 320$

(division 2). These are observed less frequently than the looping fibers of the median eminence, and have never been noticed when aldehyde-fuchsin-positive eminential loops were absent. The latter observation, together with the fact that each set of looping fibers lies in close proximity to neurosecretory material, suggests a possible functional relationship of these groups of fibers to each other and to the neurosecretory system.

A similar group of aldehyde-fuchsin-positive fibers occurs in the anterodorsal wall of the third ventricle near the choroid plexus and the pineal body. These have been described in greater detail by OKSCHE (1961). The close association of these with the blood vessels is shown in Fig. 6. A fourth set of looping fibers (not pictured) is frequently visible in the proximal part of the pineal, bordering on the lumen, and is not distinguishable in aldehyde-fuchsin sections from those described above. This will be described in greater detail in a subsequent paper on the pineal body of this species. The staining properties and highly suggestive locations of these four groups of looping fibers make them worthy of further study.

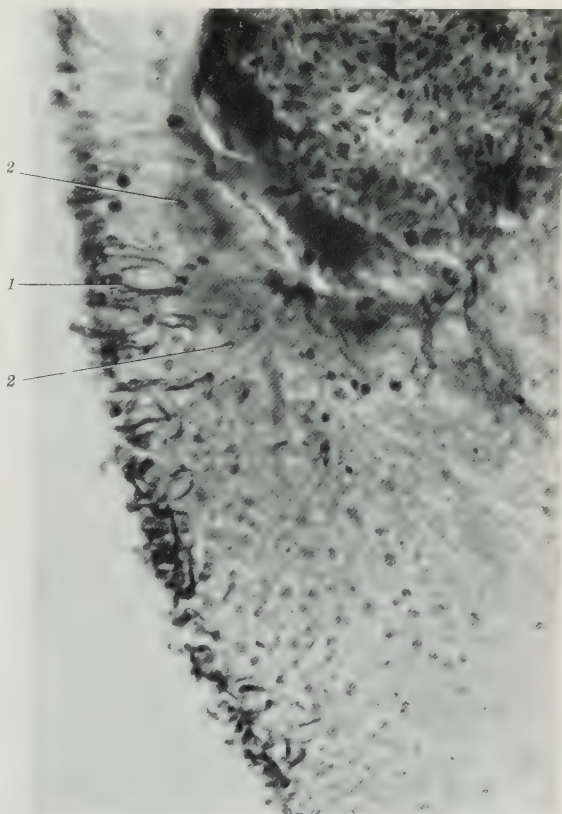


Fig. 6. Aldehyde-fuchsin-stained ependymal loops in the anterodorsal wall of the third ventricle, near the choroid plexus. White-crowned sparrow No. 27195221♂. Note the relationship in which these stand to the neighboring blood vessel. 1 loops extending towards ventricle, 2 loops extending towards blood vessel. $\times 450$

Seasonal Changes in Hypothalamic Neurosecretory Activity with Special Reference to the Refractory Period

1. Avian birds. In studying neurosecretory changes during the onset of refractoriness it was necessary to use captive birds, since testicular regression normally occurs on the breeding grounds at considerable distances from Pullman. The birds used were confined in outdoor aviaries under natural conditions of light and temperature. In such circumstances a testicular cycle occurs with regression and subsequent refractoriness as in wild birds, although regression begins several weeks earlier than in wild populations.

The main series of histological preparations was from 15 birds killed during May-September, 1959, for which details regarding body weight, testicular weight, and time and date of killing are given in Table 1. Testicular regression set in

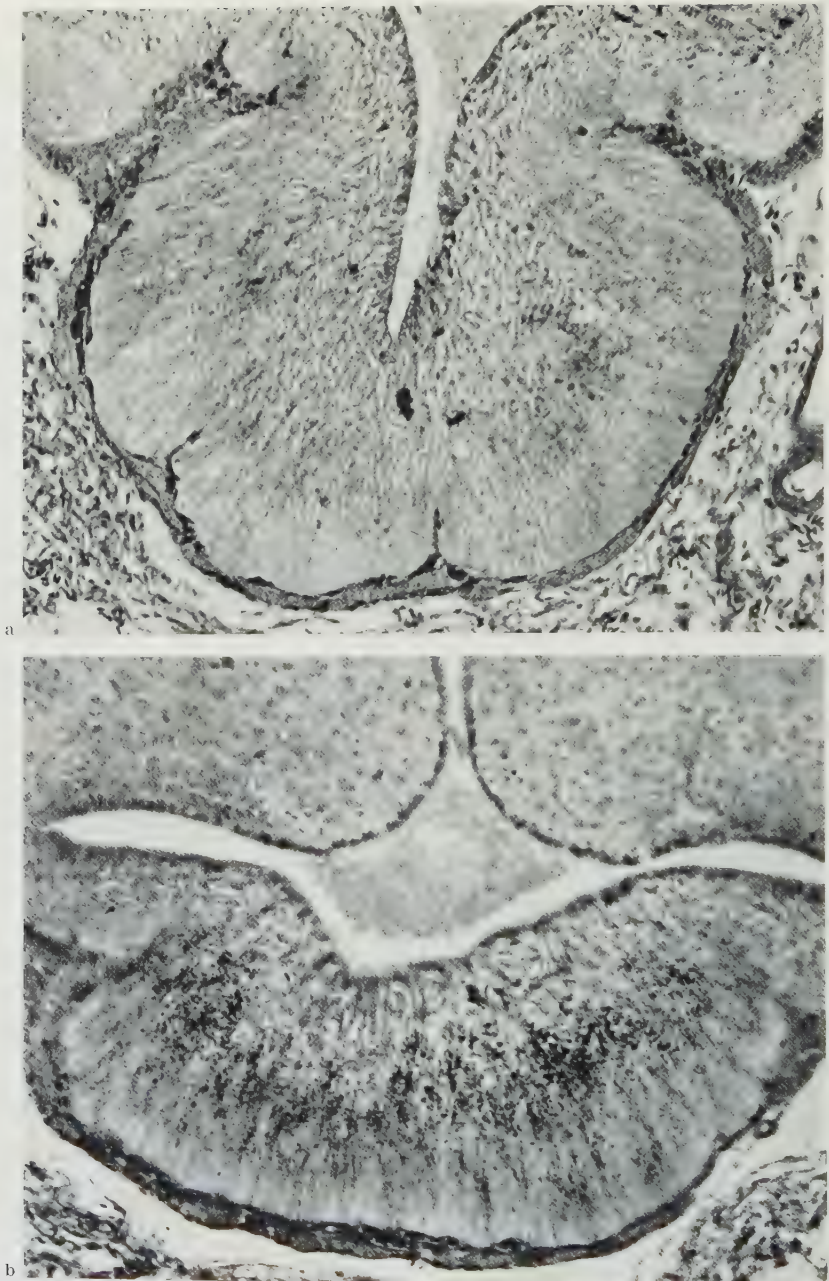


Fig. 7a—d. Transverse sections of median eminence from male white-crowned sparrows held in outdoor aviaries during the spring and summer. a 54187448 13 May, b 54187444 17 June, c 54187429 25 June, d 54187430 2 September. Inc and d the testes had regressed. See Table 1 for further details. Aldehyde-fuchsin. $\times 216$

between 17 and 25 June in this group, and examination of aldehyde-fuchsin sections revealed distinct changes in the neurosecretory system, particularly in the median eminence.

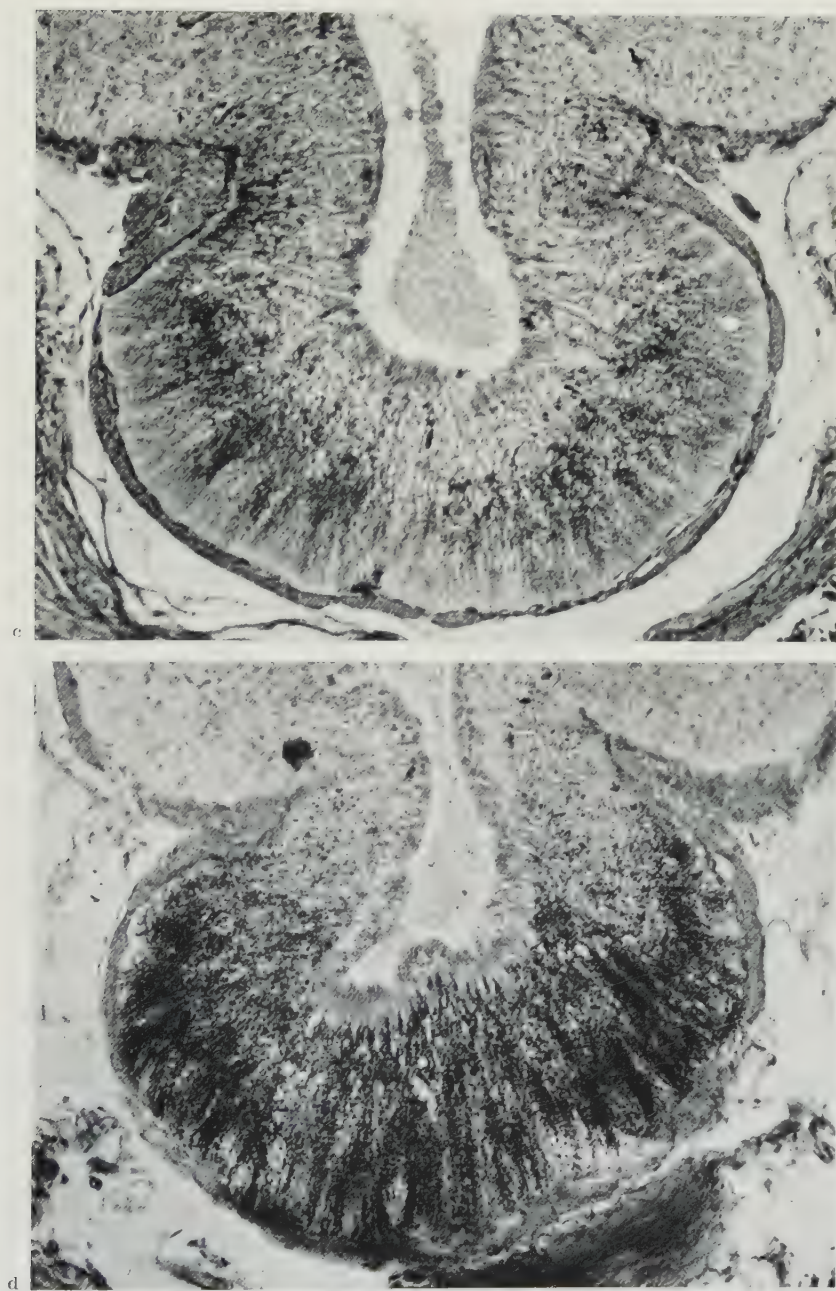


Fig. 7c—d

In *Zonotrichia leucophrys gambelii* the neurosecretory tract leading to the neurohypophysis separates from the rest of the hypothalamo-hypophysial tract in the anterior part of the median eminence. It is thus possible, in transverse sections through the middle part of the median eminence, to study separately the aldehyde-fuchsin-positive material of the neurohypophysial tract and that

in the outer part of the stratum fibrosum, and the stratum glandulare. Changes in the neurohypophysial tract and neurohypophysis are non-seasonal and do not appear to be correlated with changes in the rest of the neurosecretory system. The stratum glandulare and outer part of the stratum fibrosum show a marked seasonal trend which is particularly rapid over the period 17 to 25 June, when testicular regression began. Earlier birds in the series (from May and early June)

Table 1. *Adult Male Birds Maintained in Outdoor Aviaries on Natural Photoperiods*

Bird (1)	Body Weight (g.) (2)	Date of Killing (3)	Time of Killing (4)	Weight of Testes (mg) (5)	Neurosecretory Index				Ependymal Loops ¹ (Eminence) (10)	"Post-nuptial" Molt (11)
					Supraoptic Nucleus ¹ (6)	Lateral Cells Division 7 and 8 ¹ (7)	Lateral Tracts ^{1, 4} (8)	Median Eminence ¹ (9)		
54187448	31.5	13 May	0815	249.4	++	+	+	+	0	0
54187447	33.5	20 May	0815	354.0	++(+)	+	+	++(+)	++(+)	0
54187436	31.0	27 May	0915	298.0	++(+)	(+)	0	0	0	0
54187445	29.1	3 June	0815	382.0	++(+)	+	+	+	0	0
54187435	30.0	11 June	0810	446.4	++	(+)	++	(+)	(+)	(+)
54187444	31.0	17 June	0830	352.0	++(+)	++(+)	++	++(+)	0	(+ ?)
54187429	29.6	25 June	0830	18.33	++++(+)	+++++	+++++	++(+)	0	0
54187443	27.7	2 July	0950	5.18	++(+)	+++++	++++	++	0	++
54187431	27.5	10 July	0830	5.15	++(+)	++(+)	++	++(+)	0	++
54187442	29.5	16 July	0830	4.07	++++(+)	+++++	++++	++(+)	++	++
54187438	28.1	22 July	8055	3.91	++++(+)	+++++	++++	++(+)	++	++
54187451	—	5 Aug.	0700	1.53	+++(+)	+++++	+	++	+	(Compl.)
54187430	24.5	2 Sept.	0850	1.10	++(+)	++	+++	+++++	(+)	(Compl.)
54187437	28.1	2 Sept.	0840	1.84	(+)	(+)	+++	++++	0	Compl.)

¹ Addition signs (++) have been used to indicate density of aldehyde-fuchsin positive material, as follows: (+) — almost zero. +, ++, +++, etc. represent increasing densities of neurosecretory material. (+) is used to represent a doubtful case, e.g. ++ would represent a case intermediate between + and ++.

² Values given are for the part of the tract which lies above the supraoptic decussations adjacent to the eminence and presumably includes axons from all of the lateral divisions.

With this symbology comparisons can be made only within, and not between columns, except in the case of columns 6 and 7.

The same symbols are used in the final column, with similar significances, to indicate extent of feather replacement.

The neurosecretory index employed here may be related to that of OKSCHE *et al.* (1959) by comparing the indices given for nucleus supraopticus in Table 2 and 3 with Figs. 10, 11 and 15. These birds were hatched during the previous summer.

show only light amounts of secretion in this region (Fig. 7a). Some increase is evident on 17 June in the last bird killed before regression set in (Fig. 7b) and by 25 June (Fig. 7c) secretion in the median eminence is considerably darker than in any of the earlier birds. This increased density is maintained until 2 September, when the last birds were killed (Fig. 7d). There is some variation among the median eminences from birds whose testes have regressed, but the general indication from this series and also from specimens collected in 1957 (OKSCHE *et al.* 1959) is that accumulation reaches its maximum at about the beginning of September (Fig. 7d). Testicular regression is not accompanied by any increase of material in the neurohypophysial tract (Fig. 7c).

No trends were observed in the condition of the vacuoles of the median eminence over the period studied, although there was considerable variation in number

from bird to bird. Ependymal loops were observed in two birds killed on 20 May and 11 June and in four birds killed after mid-July (Table 1).

Anterior to the median eminence, neurosecretory tracts could not be traced back to divisions 1 through 5, even in refractory birds. By contrast, neurosecretory material in the lower part of the lateral tract (Fig. 1f) and in the axons from divisions 6, 7 and 8 began to increase shortly before testicular regression set in (11 June), and by 25 June was very dense (Table 1). No regular trends were observed after this time. Axons from division 8 showed a notable accumulation of material which was clearly visible after testicular regression, but not before. Axons from division 7 could be followed in many birds before regression, but contained more neurosecretory material afterwards. Those from division 6 (nucleus paraventricularis lateralis) could only be followed easily by means of aldehyde-fuchsin sections in two birds which were killed on 17 June and 25 June respectively. Accumulation in these axons may therefore be most pronounced at the time of testicular regression. In these two birds, axons contributing to the tract from the lateral paraventricular nucleus extended inwards almost as far as the third ventricle into the general area of the medial paraventricular nucleus (Fig. 1). It therefore seems likely that at least some of the cells from the medial paraventricular nucleus (division 4) possess axons which run to the stalk *via* this tract.

In the case of the neurosecretory cells themselves, the most obvious changes occur in the nucleus supraopticus. Neurosecretory droplets of these cells vary irregularly in both size and number, rendering comparison throughout the series difficult; even though there does appear to be an overall increase in amount of secretion as the testes regress, this cannot be stated with certainty on the number of birds used. Striking changes do, however, occur in general cellular appearance. The cells from birds with unregressed testes are large and the cytoplasm stains only lightly with fast green. Nuclei (Fig. 8a, b) are large, round and clear, with distinct outer boundaries and prominent nucleoli. By 25 June (Fig. 8c) when testicular regression is under way, the cytoplasm of the cells is shrunken, staining intensely with fast green. Nuclei are small, often irregular in outline, with indistinct boundaries and faint, often indistinguishable nucleoli. In many cases the combination of conditions renders the nuclei invisible. The evidence suggests that testicular regression is accompanied by a rapid decrease in the size and activity of cells in the supraoptic nucleus. By the beginning of September (Fig. 8d) some recovery is evident from the condition of 25 June, but the cells have still not returned completely to the condition seen in early June.

The cells of the nucleus paraventricularis magnocellularis on the whole behave similarly to those of the nucleus supraopticus. Here, however, a considerable number of smaller cells are visible before testicular regression begins. As with the nucleus supraopticus, there appears to be some accumulation of secretion in the cells at the time of regression.

Changes in the neurosecretory content of cells in lateral divisions 7 and 8 are more pronounced than in the nucleus supraopticus, as would be expected from the accumulation in the lateral tracts. In birds taken before testicular regression began most of the cells contain few droplets only, and the nuclei are large and clear with distinct nucleoli. Some increase in the size and number of

droplets is evident on 17 June, and by 25 June, when regression is under way; these are frequently numerous. They remain present in considerable numbers

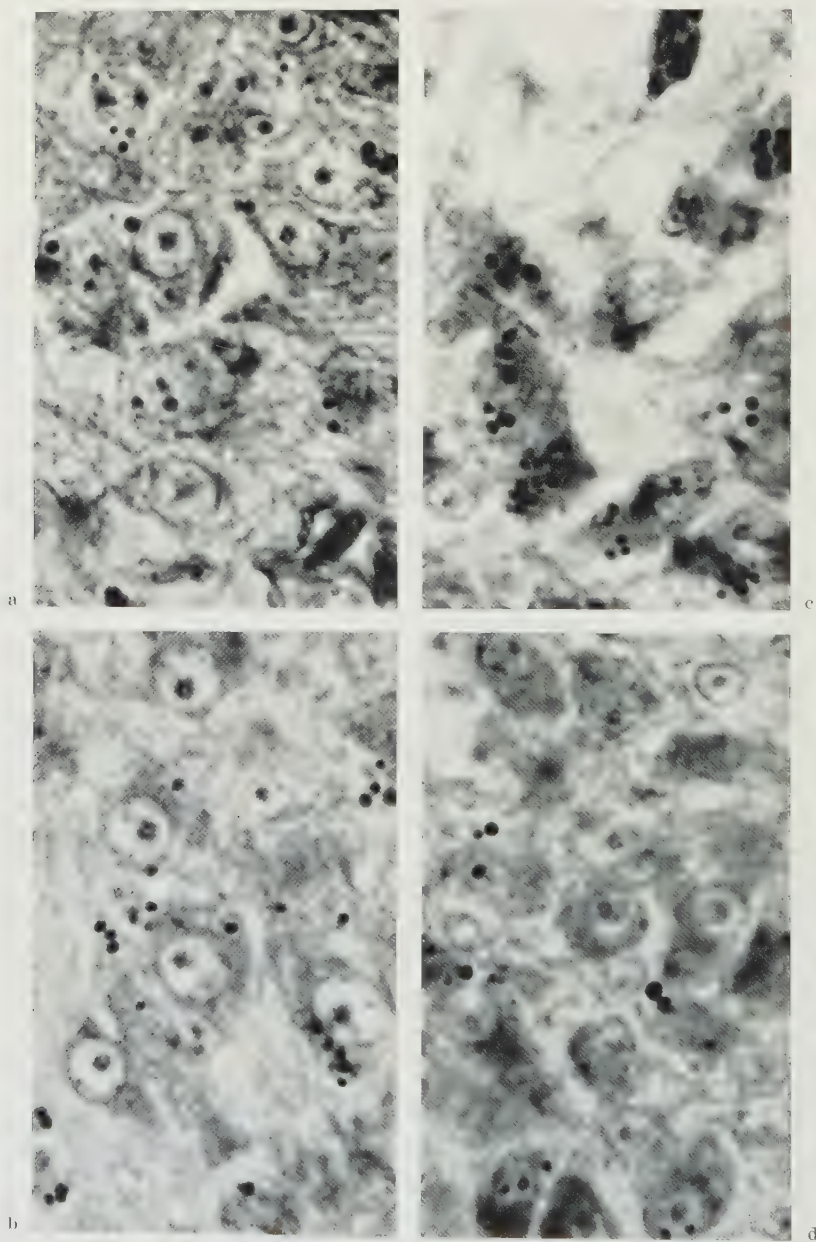


Fig. 8a—d. Transverse sections through supraoptic nuclei from male white-crowned sparrows held in outdoor aviaries during spring and summer. a 54187448 13 May, b 54187445 3 June, c 54187429 25 June, d 54187430 2 September. In c and d the testes had regressed. See Table 1 for further details. Aldehyde-fuchsin. $\times 1080$

until 5 August, but a decrease is evident in the birds killed on 2 September, one of which possesses scarcely more neurosecretory material than those killed in

May. As in the cells of the supraoptic nucleus there is a decrease in size of cell and nucleus when testicular regression occurs.

It is significant that increasing numbers of droplets begin to appear in the cytoplasm of the lateral cells on 17 June, whereas the lateral tracts show an increased density of secretion as early as 11 June. Accumulation of material in the median eminence was not clearly discerned before 17 June, but variability among individual birds is such that small differences in this region could not be established with certainty. With this qualification it appears possible that the histologic picture represents an accumulation of material beginning in the median eminence, spreading back up the axons of the lateral tracts and finally becoming apparent in the cells of divisions 7 and 8. Whether the marked changes occurring in the supraoptic nucleus represent a similar state is not apparent, as aldehyde-fuchsin-stainable material does not occur in the proximal sections of the axons concerned.

The cells of divisions 6 and 9 have not been studied in detail. Division 6 is only distinct at the time when testicular regression begins. Division 9 shows an accumulation of neurosecretory material comparable to that in the lateral areas, and first visible at the same time (17 June).

2. *Field Birds in the Refractory and Immediate Post-Refractory Periods.* These birds were captured with Japanese mist nets either from migrating flocks around Pullman or from wintering populations in the Snake River Canyon. They were killed in the field within five minutes of capture, brain and testes being fixed immediately according to the standard procedure noted above. The pertinent information on the 19 males in this series is recorded in Table 2.

As in the previous series, the most conspicuous neurosecretory changes were in the median eminence (Table 2). Median eminences from birds killed during the refractory period contain large amounts of neurosecretory material (Fig. 9a, b) mostly, as in the previous series, in the stratum glandulare and outer part of the stratum fibrosum. In many cases by far the greater amount, on occasion virtually all, occurs in the stratum glandulare. The amount of neurosecretory material in the neurohypophyseal tract is variable but without seasonal trends. Between 10 and 17 October the density of material in the median eminence decreases rapidly to an extent which cannot be attributed to individual variation (Fig. 9b, c), and the new, reduced level is maintained thereafter with some increase in December (Fig. 9d, Table 2). In the previous series of aviary birds it was possible to correlate the rapid *increase* in eminential neurosecretory material between 17 and 25 June with *regression of the testis*. In the present series *no detectable change in gross testicular weight* accompanies the *decrease* in neurosecretory material within the median eminence. It does, however, seem possible that the decrease is coincident with the end of refractoriness, since the change is opposite to that which occurs in aviary birds when testicular regression begins. FARNER and MEWALDT (1955) found that six out of nine birds responded to experimental lighting begun on 25 October, and LAWS (unpublished) has obtained a positive response with three out of six birds placed on experimental lighting as early as 20 October. One might expect that the changes in the neurosecretory system which signal the end of refractoriness would precede somewhat the earliest time at which a testicular response could be obtained.

Table 2. *Birds Collected in the Field between September 18th and December 30th 1957*

Bird	Body Weight g	Date of Killing	Time of Killing	Weight of Testes mg	Neurosecretory Index							Ependymal Loops ¹ (Eminence)	Age of Bird ²
					Supraoptic Nucleus			Lateral Cells Divisions 7 and 8 ¹	Lateral Tracts ¹	Median Eminence ¹			
					Neuro-secretion ¹	Cell Size ²	Nuclear Size ²				Nucleolar Size ²		
5709181	—	18 Sept.	0945	0.1	— ()	L	L	M	—	—	0	Fy	
5709183	—	18 Sept.	1020	1.3	(-)	M-S	M-S	M	()	(-)	—	Ad	
5709231	33.0	23 Sept.	1605	1.4	— ()	S	S	S	()	(-)	(-)	Ad	
5709233	33.0	23 Sept.	1645	3.0	()	M	M	M	()	()	0	Ad	
5710032	24.5	3 Oct.	1525	1.2	(-)	M	M	M	()	—	0	Fy	
5710101	26.0	10 Oct.	1320	4.0	(-?)	M	M	M	0	—	0	Ad	
5710102	34.0	10 Oct.	1355	2.4	+()	M	M	M-S	0	++	+	Fy	
5710172	27.1	17 Oct.	1650	3.0	(-)	S	M	S	0	0	0	Fy	
5710241	28.0	24 Oct.	1315	3.1	—	M-L	M-L	L	0	0	+	Ad	
5710243	28.0	24 Oct.	1325	0.9	—	M-L	M-L	M-L	0	(+?)	+	Fy	
5710311	25.7	31 Oct.	1345	2.4	—	L	L	L	0	(+?)	+	Ad	
5711071	—	7 Nov.	1125	1.2	—	M-L	M-L	M	0	0	+	Ad	
5711141	26.0	14 Nov.	1125	0.6	—	M-S	M-S	M-S	++	(+)	0	Ad	
5711142	23.7	14 Nov.	1125	0.1	—	M	M-S	M-S	++	(+)	0	Fy	
5711292	—	29 Nov.	1550	—	+()	M-S	S	M	++	++	0	Fy	
5712051	29.8	5 Dec.	1030	1.0	—	M	M-S	M	++	++	+	Ad	
5712191	26.7	19 Dec.	1015	2.0	(-)	M	M	M	0	0	—	Ad	
5712192	25.5	19 Dec.	1025	0.8	—	M	M	M	++	++	—	Fy	
5712301	27.5	20 Dec.	1120	2.6	+	M	S	M	++	++	0	Ad	

¹ Use of addition signs to express density of aldehyde-fuchsin-positive material is explained in footnotes to Table 1.

² L = large, M = medium, S = small.

³ Fy = first-year bird, Ad = adult bird.

None of these birds were in molt.

Aldehyde-fuchsin-positive looping ependymal fibers occur only in the median eminences of adult birds in this series of preparations (Table 2). They occur in two out of four adults killed before mid-October, and in three out of seven adults killed later. No inferences can be drawn from this series concerning their function.

As in the previous series, vacuoles are frequently observed in the median eminence, but show no recognizable seasonal trends.

Anterior to the median eminence the tracts from the supraoptic and paraventricular nuclei are not visible in the aldehyde-fuchsin preparations. The lower section of the tracts (Fig. 1d) can, however, be easily identified and shows pronounced changes with season (Table 2). Birds killed before early October show slight or medium amounts of neurosecretory material. A reduction in quantity occurs in mid-October, and from this time until 10 November (inclusive) scarcely any material is visible. Moderate amounts of neurosecretion appear on 14 November, and with one exception (bird 191) continue to be present until the end of the series. The lateral tracts can be traced anteriorly for some distance, and a significant amount of neurosecretory material appears to come from divisions 7 and 8. Axons from other areas cannot be discerned.

The amount of neurosecretory material in the cell bodies of divisions 7 and 8 varies in direct correlation with that in their axons. Until 10 October small amounts of secretion are present, generally in finely dispersed form, although droplets (up to two or three per cell — 5709181, 5710102, Table 2) may be present. In 5709233 there is almost no neurosecretory material. From 10 October until 7 November no aldehyde-fuchsin-positive material at all is visible in the cells. From 14 November, with one exception (5712191, killed 19 December) cells contain moderately large amounts of material, and droplets become more numerous in the cytoplasm, frequently as many as eight or nine.

Scarcely any material is visible in the cells of the lateral paraventricular nucleus (division 6) throughout the period studied. The cells of division 9 have not been studied in detail, but the changes here appear on cursory examination to follow those of divisions 7 and 8.

The changes in the lateral cell areas and tracts suggest that between 10 October and 7 November there occurs either a decreased formation or an increased release of material from the lateral neurosecretory regions. The nuclei of these secretory cells are larger, rounder and more distinct during this period than either before or after suggesting that the cells are more active and hence synthesizing more neurosecretory material. The factor involved in reducing the amount of neurosecretory material must therefore be something which increases the rate of release so that the neurosecretory content is lower despite the increased synthetic activity of the cell. Considering the changes which take place in the median eminence over the period it seems most likely that it is there that the increase in release of material occurs.

Any trends in neurosecretory activity which might be occurring within the supraoptic nucleus in this series are obscured by individual variation (Table 2), although two of the first birds killed (5709181 and 5709231) contain more aldehyde-fuchsin-positive material than was ever observed later. It is possible that trends might become apparent if the neurosecretory system could be studied

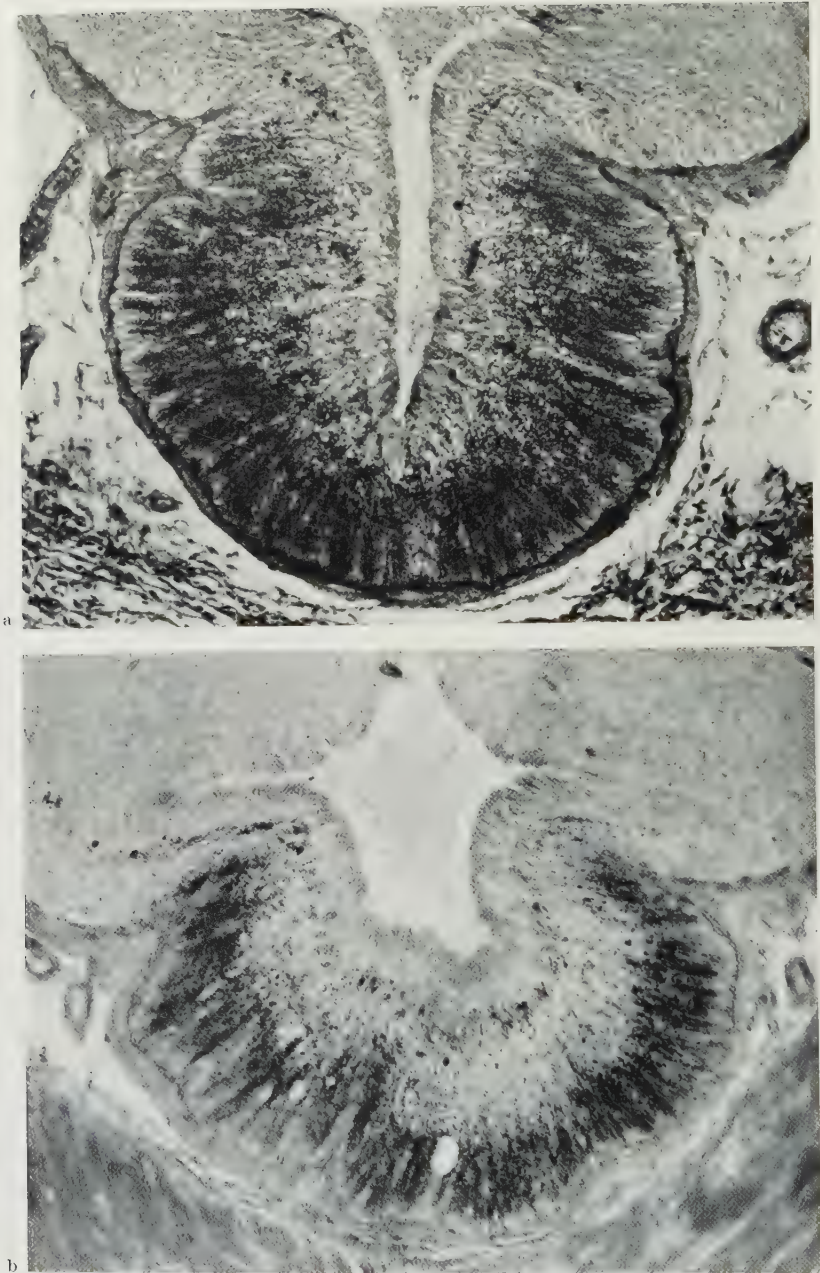


Fig. 9a—d. Transverse sections of median eminences from male white-crowned sparrows killed in the field during fall. a 5709181 18 September, b 5710102 10 October, c 5710172 17 October, d 5711072 7 November. There appears to be a period of rapid change in neurosecretory content during mid October. See Table 2 for further details. Aldehyde-fuchsin. $\times 216$

over a greater part of the year. To supplement neurosecretory information it has therefore been necessary to study the actual cell more closely and make individual observations on cell size, nuclear size, and size and prominence of

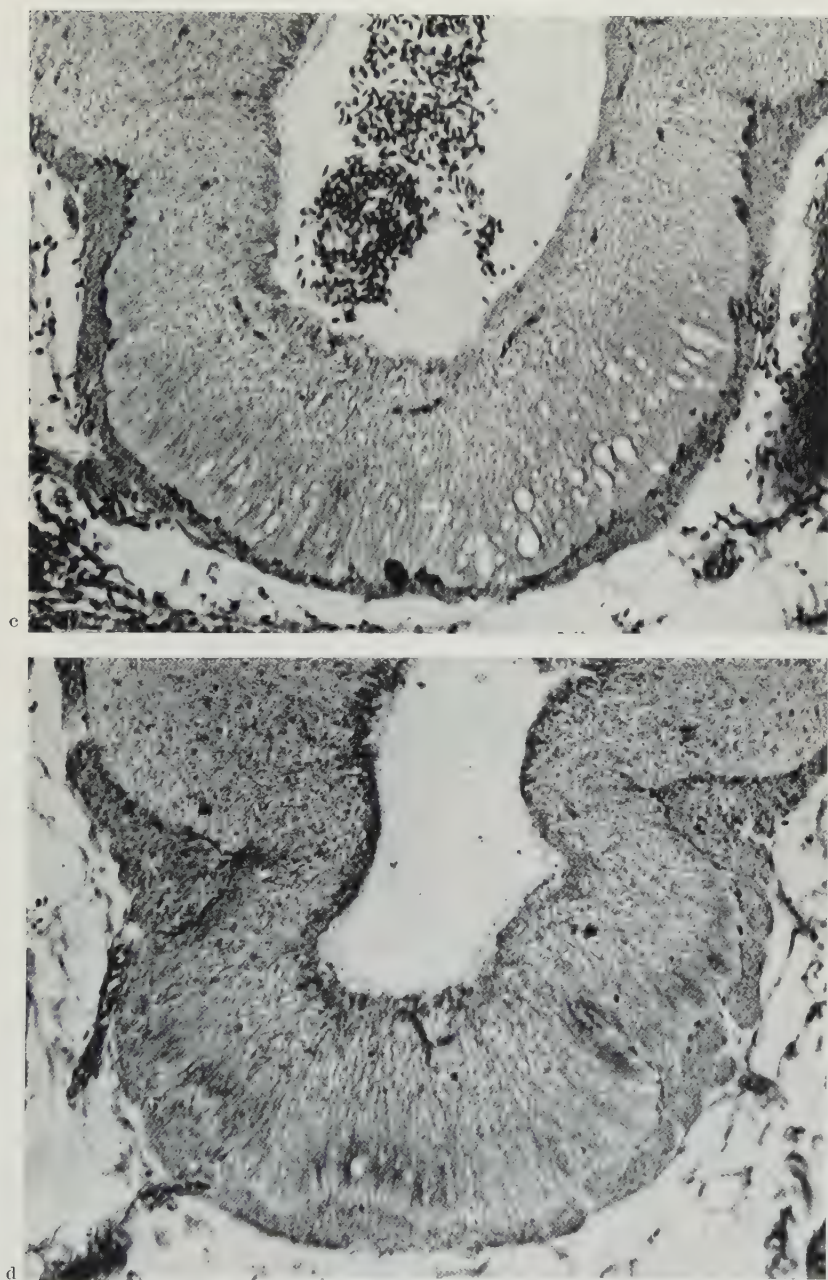


Fig. 9 c—d

nucleolus (Table 2). Between 17 October and 7 November cell, nucleus and nucleolus are somewhat larger. Furthermore, there are less irregularly shaped nuclei, clear round ones with a distinct membrane becoming common. Both nucleus and cytoplasm, with the increase in size of the cell, show decreased affinity for fast green. These changes in cell state suggest an increase in activity over the period from late October until 7 November (Fig. 10a—c, Table 2).

The changes observed in median eminence, lateral tracts, lateral neurosecretory cells and supraoptic nucleus are consistent with one another, and suggest that the decrease in cell activity and increase in neurosecretory material which accompanies testicular regression is followed by a brief resurgence of activity

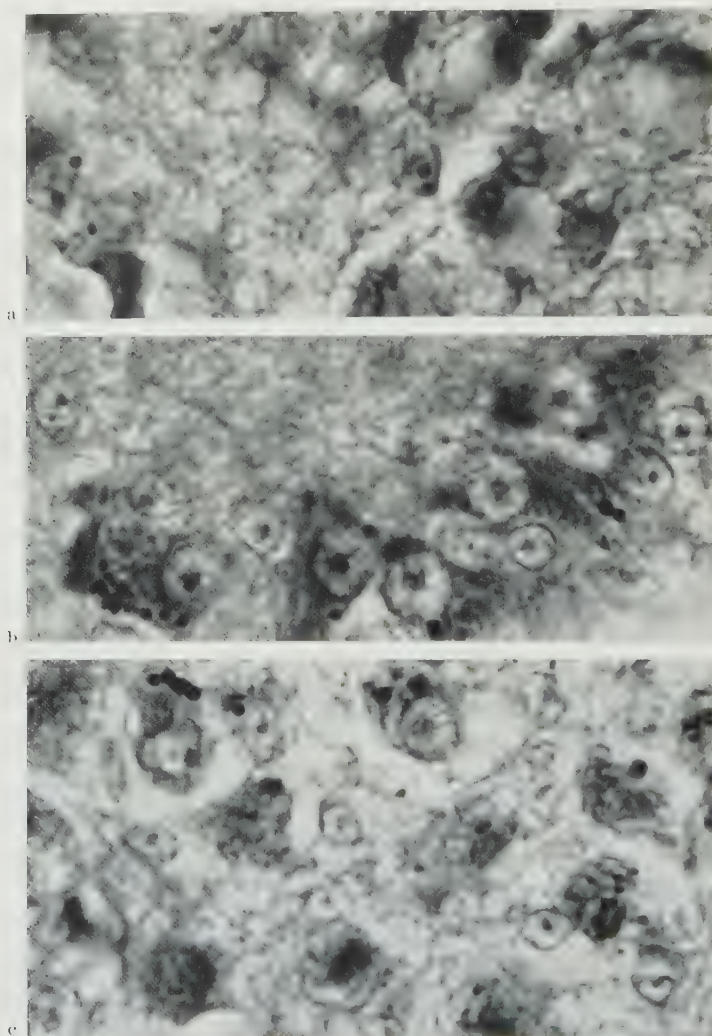


Fig. 10a—c. Transverse sections through supraoptic nuclei from male white-crowned sparrows killed in the field during fall and early winter, a 5709231 23 September, b 5710311 31 October, c 5712192 19 December. Nuclear size is maximal in the bird killed on 31 October. See Table 2 for further details. Aldehyde-fuchsin. $\times 1080$

in late October and early November. Later in the season the cells return to a less active state.

3. *The Neurosecretory Cycle in Relation to Refractoriness — an Integrative Resumé.* It appears possible to integrate the information obtained from the above two series of histological specimens and obtain a picture of the seasonal neurosecretory cycle in relation to refractoriness. The increase of material in the

neurosecretory system, particularly the median eminence, between 17 and 25 June in aviary birds is in diametric contrast to the *decrease* in field specimens between 10 and 17 October. It therefore seems justifiable to extrapolate the increase accompanying testicular regression to wild populations. Reviewing the data, the pattern of events in the fall cycle of the neurosecretory system would appear to be as follows: The neurosecretory content of the system is low during the breeding season. Cells of the supraoptic nucleus, of lateral divisions 7 and 8, and probably of other areas as well, are large and active. At the time of testicular regression an accumulation of aldehyde-fuchsin-positive material occurs, beginning first in the median eminence, then spreading back along the neurosecretory axons to lateral nuclear divisions 7 and 8 and apparently to other parts of the neurosecretory system also (in particular to the supraoptic nucleus), as though loss of secretion from the axons in the median eminence had ceased. The accumulation of secretion is accompanied by a decrease in the amount of cytoplasm and in the size of the nuclei of the cells concerned, suggesting a decrease in cell activity. Except for a brief period in late October and early November, when there is a transient increase in activity, the increased quantity of neurosecretory material and the decreased level of cell activity are maintained until late winter (FARNER and OKSCHE, unpublished observations). The transient increase in activity occurs during the earliest period in which the birds can respond to artificially increased daily photoperiods. The possible significance of this will be considered below in the discussion.

Since, as shown above, the morphological changes can be related to significant events in the testicular cycle, the data favor the view that one function of the neurosecretory system is to cause the release (or perhaps formation and release) of gonadotropins. One question remains. Can the resurgence of activity seen in late October and early November be correlated with any event in the cycle? If *Zonotrichia leucophrys gambelii* showed some degree of testicular enlargement in the fall, as occurs in many other passerine birds (MARSHALL 1952), the data would be readily understandable in terms of gonadotropic function. No actual fall recrudescence of the testis has ever been observed, but considering that it is a recognizable feature of the annual cycle of a large variety of species, the possibility exists that the brief reactivation of the neurosecretory system which is visible here might represent a resurgence of gonadotropic activity which either is not intense enough, or does not continue long enough, to cause noticeable testicular enlargement. Confirmation of this viewpoint might be forthcoming from a study of the interstitial cells of the testis, and particularly of Leydig cells which one might expect to show some degree of response to gonadotropic stimuli. BLANCHARD and ERICKSON (1949) do not record Leydig cells in *Zonotrichia leucophrys gambelii* until early January. There appears to be some doubt, however, as to what may be designated Leydig cells (FARNER and MEWALDT 1955). In view of investigations such as that of THREADGOLD (1956) who has established an autumnal increase in the number of interstitial cells for the jackdaw (*Corvus monedula*) without pronounced change in either testicular size or diameter of the seminiferous tubules, the matter is certainly worthy of further study. The possibility might even be raised that a factor causing the release of interstitial-cell-stimulating hormone (ICSH) is involved specifically in this case.

Seasonal Changes in Sensitivity to Long Daily Photoperiods

The results described above show that the greatest density of aldehyde-fuchsin-stainable material in the hypothalamic neurosecretory system occurs during the refractory period. Indeed, during this period the system appears to be in a storage state. With respect to the nature of the refractoriness there is the question as to whether it terminates relatively abruptly, as has often been assumed, or whether there is actually a prolonged increase in sensitivity of the response mechanism from zero to maximum with the period of maximum increase in sensitivity being that usually regarded as the "termination of refractoriness". Such an inquiry might be made equally well for the beginning of refractoriness. The end has been selected for investigation here only because more information is available about it, and because it is easier to study experimentally. There is available in the literature considerable information which suggests that rates of testicular responses do, in fact, increase as the season progresses. The data of BENOIT, ASSENMACHER and WALTER (1950) show that the testes of Pekin and Rouen ducks respond more rapidly to photoperiodic stimulation as the period between the onset of testicular regression and photostimulation is increased. From the investigations of VAUGIEN (1955) it appears that first-year house sparrows (*Passer domesticus*) show a more rapid response to light as the fall and winter progress. He concludes that, although age is partly responsible for the results, the short day lengths of fall and winter, expressing themselves in both the activity of the gonadostimulatory mechanism and the responsiveness of the testis, are the most significant causal factor. SHANK (1959) has obtained similar data for the slate-colored junco (*Junco hyemalis*). His results include data for three slate-colored juncos pretreated with 9-hour photoperiods which show a considerably more rapid rate of response than birds on natural day lengths prior to experimentation. This strongly suggests photoperiod as a causal agent.

The following experiments were made to discover whether such seasonal changes in rate of testicular growth occur in *Zonotrichia leucophrys gambelii*, and if so, to characterize them quantitatively and relate them to the fall and winter neurosecretory cycle.

Since the rate of testicular growth is somewhat higher in adult than in first-year birds (FARNER and WILSON 1957) separate experiments have been performed with each age-group. Adult birds are defined for present purposes as birds which have undergone a prenuptial molt and have passed through at least one testicular cycle under natural conditions. First-year birds are birds, hatched during the previous summer, which have undergone neither a prenuptial molt nor a testicular cycle.

1. *Adult Birds on 15-hour Photoperiods.* In this experiment groups of birds were placed on 15-hour photoperiods at approximately monthly intervals from 24 September until the beginning of March (Table 3). Mean logarithmic growth-rate constants (k), with 95% confidence intervals, were calculated for each group (see section on methods). These are shown in Table 3, and k is plotted as a function of time in Fig. 11. The first group (24 September) has an essentially zero rate constant, as would be expected. In Group 2 (begun on 1 November) 50% of the birds were still refractory. Only the responsive males have been used in calculations. The k value for the three completely refractory birds (Table 3) would be zero, as in Group 1.

Table 3. *Testicular Growth with 15-hour Photoperiods. Adult Birds, 1958—1959*

Group	Number of Birds	Initial Date	Days of Treatment before Killing	Mean Testis Weight \pm S. E. mg	k (days ⁻¹)	
					Mean	95 % Confidence Interval
1	12	24 Sept.	40	1.25 \pm 0.085	0.003	0.000—0.006
	15		0	2.03 \pm 0.21		
2	3	1 Nov.	42	108.3 \pm 39.1	0.039	0.031—0.047
	9		0	2.10 \pm 0.30		
	3 ¹		42	1.4 \pm 0.18		
3	14	1 Dec.	33	136.2 \pm 14.0	0.061	0.056—0.066
	23		0	1.07 \pm 0.12		
4	10	2 Jan.	30	115.5 \pm 11.7	0.061	0.056—0.066
	12		0	1.65 \pm 0.15		
5	5	2 Feb.	27	38.2 \pm 4.9	0.055	0.048—0.062
	4		26	37.6 \pm 10.6		
	1		20	10.8		
6	18	1 March	0	1.31 \pm 0.18	0.061	0.055—0.067
	9		27	108.3 \pm 10.5		
	8		0	2.39 \pm 0.27		

¹ These birds were refractory and were not used for k calculations.

As may be seen from the 95 % fiducial limits, a highly significant difference exists between the rate constants for the groups begun on 1 November and 1 December. A t test on the data gives $p < 0.001$. It therefore appears that when adult birds emerge from refractoriness the testicular growth-rate (as measured with 15-hour photoperiods) is low initially and increases comparatively rapidly to a higher level. Later groups in this experiment show no significant changes in k . The value for 2 February is low, but insignificantly so on the basis of this experiment, and still significantly higher than that for 1 November.

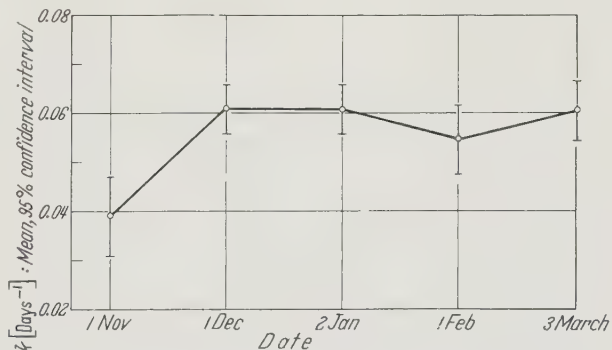


Fig. 11. Rate of testicular development, k , as a function of time of year, for adult white-crowned sparrows treated with 15-hour photoperiods during 1958—1959. Numerical details are given in Table 3

2. *First-year Birds on 15-hour Photoperiods.* In the case of first-year birds investigations using 15-hour photoperiods gave rather complex results. Reasons for this are suggested by LAWS (1960), and it appears that experimental technique was at least in part responsible. As with adult birds, however, k was virtually zero for a group of birds begun on 24 September, and the same was true for four out of eight males which were placed on long photoperiods on 1 November (see LAWS 1960, for complete results). After 1 November sizeable values of k were obtained.

3. *First-year Birds on 20-hour Photoperiods.* To supplement the 15-hour experiments a series of investigations was carried out using 20-hour photoperiods, to see whether increased photostimulation would demonstrate increased seasonal

changes in k . The data are given in Table 4, and the values for k are plotted against time in Fig. 12. As may be seen, k increases steadily from 2 November through 31 January. In the group begun on 2 November the testicular response is uneven and the 95% confidence interval for k is very large. Therefore, although k is low as compared with the value for 22 November or 1 January, the difference is clearly not statistically significant. It is, however, plain that the groups for 2

Table 4. Testicular Growth with 20-hour Photoperiods. First-year Birds, 1959–1960

Group	Number of Birds	Initial Date	Days of Treatment before Killing	Mean Testis Weight \pm S.E. mg	k (days ⁻¹)	
					Mean	95 % Confidence Interval
1	8	2 Nov.	19	29.4 \pm 6.0	0.073	0.050–0.096
	20		0	0.92 \pm 0.20		
2	9	22 Nov.	28	141.5 \pm 20.5	0.085	0.076–0.094
	9		0	0.69 \pm 0.14		
3	5	1 Jan.	19	50.0 \pm 8.7	0.098	0.086–0.110
	6		0	0.42 \pm 0.26		
4	9	31 Jan.	20	78.6 \pm 5.3	0.106	0.101–0.111
	9		0	0.61 \pm 0.05		
5	8	3 April	20	86.0 \pm 8.5	0.104	0.101–0.107
	8		0	0.67 \pm 0.04		
6	7	30 May	21	240.8 \pm 16.0	0.113	0.101–0.125
	10		0	1.20 \pm 0.32		

and 22 November each have a k value which is significantly lower than that for any group begun after mid-January. A k obtained from the pooled data of groups 1 and 2, when compared by t -test with a value obtained similarly from the pooled data of groups 4, 5 and 6 gives $p < 0.001$. The group begun on 1 January appears

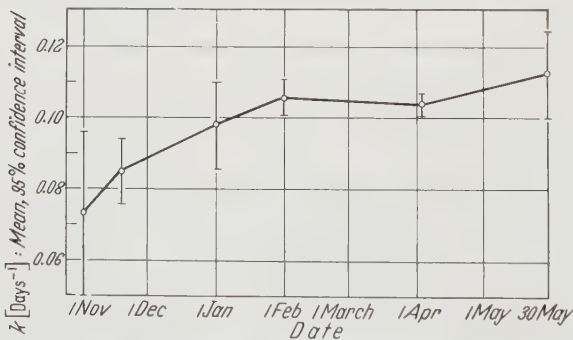


Fig. 12. Rate of testicular development, k , as a function of time of year, for first-year birds treated with 20-hour photoperiods during 1959–1960. Numerical details are given in Table 4

to be intermediate. Although the group of 30 May shows a slightly higher k than the preceding ones, the 95% confidence interval is large, so that the data give no real evidence in favor of any rate increase later than the end of January. The rate-increasing effect of short days therefore appears to be complete after three months.

Since in both Experiment 1 with adult birds, and in Experiment 2 with first-year birds, a similar increase in responsiveness was found to occur over late fall and early winter, it seems unlikely that age is the significant factor, as has been suggested for other species by WOLFSON (1958, 1959c) and VAUGIEN (1955). Nor does it appear that the lower rate of late autumn and early winter is the consequence of a previous testicular cycle, since the first-year birds of Experiment 2 were nestlings during the previous season and had undergone no

such cycle. It therefore seems most logical to relate the seasonal changes in rate to the gonadotropin-releasing mechanism itself, *i.e.* to the system controlling the adenohypophysis.

Discussion

This investigation has demonstrated that, with the onset of testicular regression, a rapid accumulation of neurosecretory material occurs in the median eminence,

the lateral tracts and the lateral neurosecretory cells, and that, particularly in the supraoptic region, both cells and cell nuclei decrease markedly in size. Accumulation of neurosecretory material may begin first in the median eminence, although the amount of individual variation here is too great for such a statement to be made with certainty. It does, however, occur earlier in the lateral tracts than in the lateral neurosecretory cells (Table 1) and precedes by a short period any visible reduction in the size of neurosecretory cells and cell nuclei. It therefore seems possible that with the onset of refractoriness the release of neurosecretory material (or some component thereof) from the median

eminence into the portal system is prevented. As a result gonadotropins in the blood decrease to an insignificant level, and the testes regress. Within the neurosecretory system the accumulation of aldehyde-fuchsin-positive substance leads, probably by feedback phenomena (FARNER *et al.* 1960), to a decrease in cellular activity and a consequent reduction in size of cell, nucleus, and nucleolus.

An inverse series of changes occurs in mid-October, shortly before the end of complete refractoriness to light can be demonstrated. This suggests that the termination of refractoriness involves a resumption of ability to release material into the portal system. If these interpretations are correct, one would not expect an absolute difference between the refractory and responsive states, *i.e.* inhibition

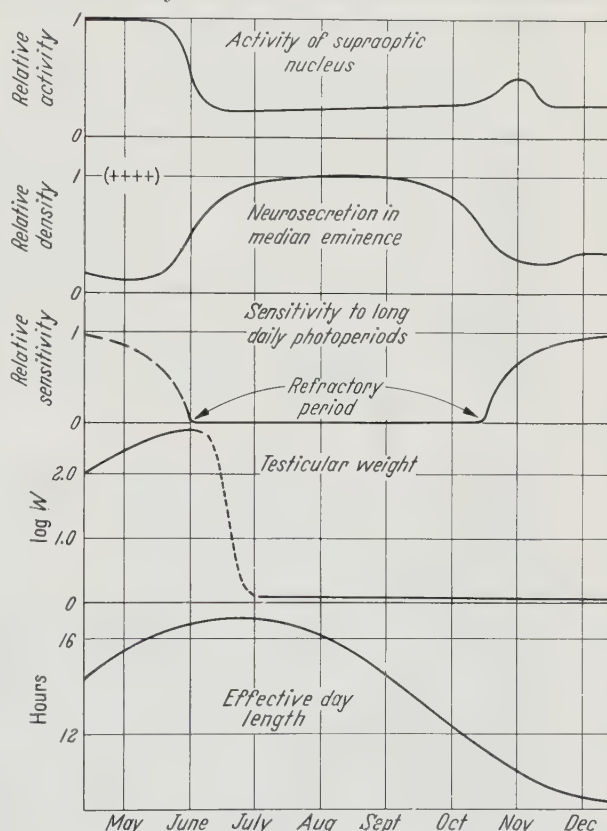


Fig. 13. Schematic representation of seasonal changes in the hypothalamic neurosecretory system and in sensitivity to photoperiodic stimulation of the system regulating gonadotropin release in relation to the testicular cycle in the white-crowned sparrow. This diagram is intended to point out general relationships only

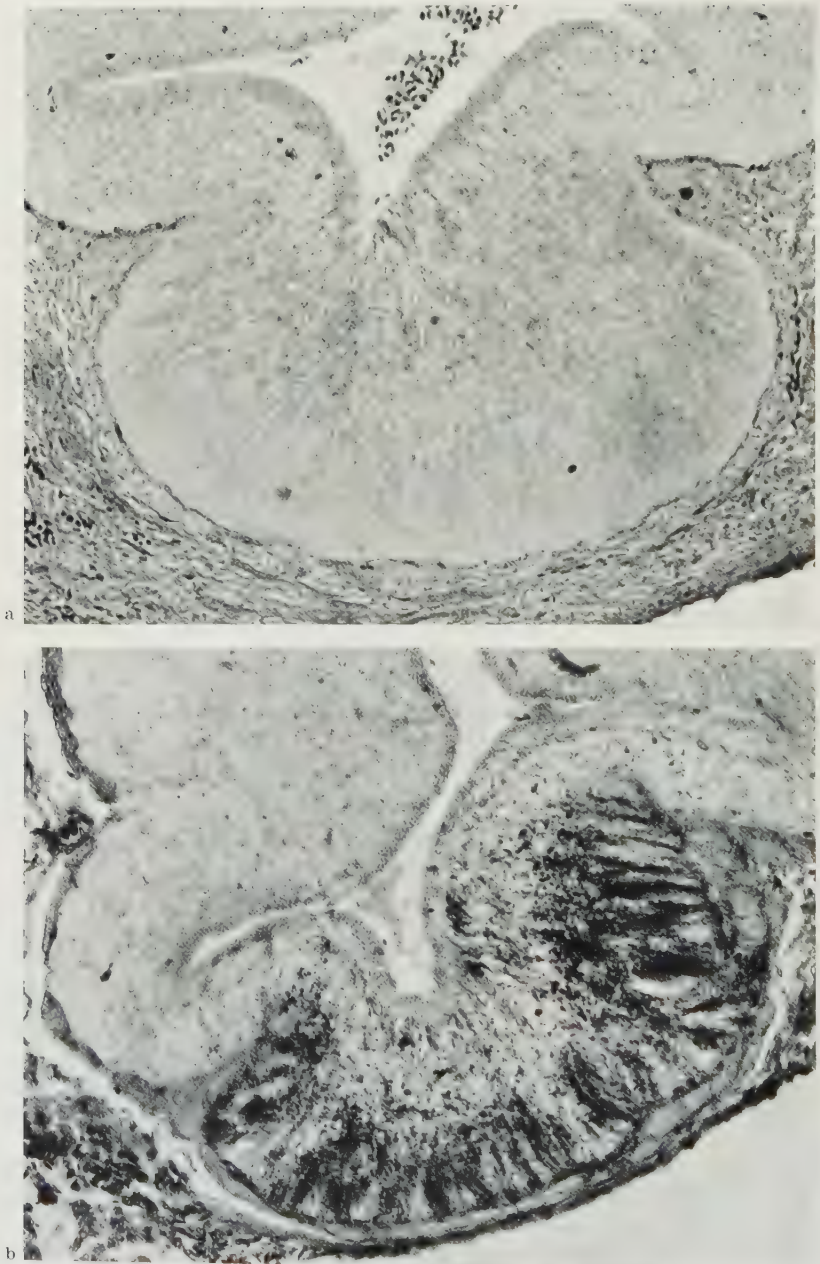


Fig. 14 a and b. Transverse sections of median eminences from castrated male white-crowned sparrows held in outdoor aviaries. a No. 24184857, 3 June; b No. 24184764, 27 August. These sections were taken from the posterior part of the median eminence, where the seasonal change appears to be greatest, the bird killed on 3 June containing almost no neurosecretory material. Anteriorly, more neurosecretory substance is apparent in both cases, and the eminence of the 3 June bird is noticeably richer than those of noncastrated birds killed at the same time (OKSHE *et al.*, 1959). Aldehyde-fuchsin. $\times 216$

at the level of the median eminence should develop and disappear over an appreciable period of time; therefore one would expect to detect it under some circum-

stances even in birds whose testes could be photoperiodically stimulated. Such changes, on a cytological level, would probably not be large, and their detection would be complicated by individual variation. In the present investigations it has been possible to demonstrate experimentally that, in November and December, when refractoriness has ended, the response of both adult and first-year birds to photoperiodic treatment is slower than later in the season. It seems most likely that this slower rate of testicular development (Fig. 12) does reflect a low-level inhibition of release from the median eminence into the portal vessels, *i.e.* a residual low-level activity of the mechanism responsible for refractoriness. If this were true, one would expect also that an effect of the inhibitory system would be apparent shortly before birds became completely refractory to light when testes are at maximum size. It has been demonstrated (FARNER and WILSON 1957) in *Zonotrichia leucophrys gambelii* that the rate of testicular growth decreases continuously after the combined weight of the testes has reached approximately 200 mg. There is little doubt that the situation here is complicated by feedback from the enlarged testis (BENOIT, ASSENMACHER and WALTER 1950), but the results are in conformity with the hypothesis advanced above, even if not supplying definite evidence in its favor. A general diagram of the main seasonal changes which have been observed in this investigation is given in Fig. 13, the partly hypothetical nature of which requires no emphasis.

Can the accumulation of neurosecretory material which occurs during refractoriness be ascribed to feedback from the testis? Such a question must be raised, since a feedback system regulating maximal testicular size has been demonstrated by BENOIT, ASSENMACHER and WALTER (1950). This question cannot at present be answered conclusively. In Fig. 14, however, are shown the median eminences from two castrated birds maintained in outdoor aviaries and killed on 3 June 1957 and 27 August 1957 respectively. It is clear that the accumulation of secretion over this period parallels that which occurs in intact birds under the same conditions (OKSCHE *et al.* 1959). Dissection under a binocular microscope revealed no regenerated testicular tissue. Since one can distinguish by naked eye testes with combined weights as low as 0.5 mg, it seems certain that there was no significant regeneration. Therefore, if the accumulation of neurosecretory material which occurs in fall has any connection with refractoriness, it appears that testicular feedback is not essential in this regard, despite its undoubted significance in regulating the maximal size which a testis can reach. The cause of the inhibitory process which occurs in the median eminence during refractoriness must therefore be sought elsewhere.

With regard to the disappearance of refractoriness in late October, day length is of some interest. The reduction in neurosecretory content of the median eminence which precedes the end of refractoriness occurs between 10 and 17 October, when the effective day length (sunrise to sunset, plus civil twilight) is between 11 and 12 hours. Since refractoriness has been shown to be regulated in some way by photoperiod, it seems possible that the inhibitory process might occur as a response to daily photoperiods of 12 or more hours. Experiments with a bearing on such a possibility have been performed by WOLFSON (1958, 1959a) on the slate-colored junco (*Junco hyemalis*) and the white-throated sparrow (*Zonotrichia albicollis*). For the former it was shown that refractory

birds, when treated with 12-hour photoperiods, become capable of responding to light. Since non-refractory birds will show testicular growth on daily photoperiods of less than nine hours (WOLFSON 1959b) it seems that refractoriness in *Junco hyemalis* requires photoperiods somewhat longer than 12 hours, and therefore reflects a response to light which is not completely identical with that causing testicular growth.

If it is true that refractoriness requires longer daily photoperiods than are necessary for gonadal growth one would expect that on intermediate photoperiods, long enough to cause detectable testicular growth but too short to cause a pronounced inhibitory response, testes would increase slowly to maximal size and remain large either indefinitely, or for a much longer time than usual. This appears to be the case since in a group of *Junco hyemalis* placed on 12-hour photoperiods from 6 April testicular activity was maintained for about nine months (WOLFSON 1952a, b; 1959).

A scheme such as proposed above, involving photoperiodically induced stimulatory and inhibitory responses which reach effective levels of activity at photoperiods of different durations, would explain the peculiar increase in activity which was noted within the neurosecretory system in late October and early November in field birds. Thus, with the decrease in day length in mid-October to less than 12 hours and the consequent termination of complete refractoriness, the response system, being sensitive to photoperiods as short as nine or 10 hours (FARNER and WILSON 1957), might show some renewed activity of the neurosecretory cells. This activity would be brief, and would disappear as days continued to become shorter. It must be assumed that release of gonadotropins over this period either does not continue long enough, or is not intense enough, to cause noticeable testicular enlargement. As stated previously, a fall recrudescence of the gonads, and even occasionally fall breeding, have been noted in a considerable number of species (MARSHALL 1952). An autumnal increase in the number of interstitial cells, without significant testicular enlargement, has also been observed in the jackdaw, *Corvus monedula* (THREADGOLD 1956).

If the inhibitory process proposed above were controlled photoperiodically, and were capable of reaching an effective level of activity on photoperiods slightly longer than 12 hours, it must be postulated that it does so only very slowly. This postulation is essential, since natural photoperiods at Pullman reach a length of 12 hours in March, whereas birds in outdoor aviaries do not become refractory until June. Such a slow response is not characteristic of a nervous process, and it therefore appears that somewhere in the chain of events leading to inhibition in the eminence there is a slow reaction of a chemical or endocrine nature. The site of this reaction, if it exists, is for future research to discover.

The way in which the effect of photoperiods of 12 hours or more is transmitted to the inhibitory system to cause refractoriness cannot as yet be determined. THREADGOLD (1960) has suggested that the inhibitory process involved in refractoriness is mediated by a second group of light receptors not identical with those which mediate the positive gonadal response. Since investigations designed to localize the photoreceptors involved in gonadal responses have always used gonadal growth rather than gonadal inhibition as a criterion (BENOIT

and ASSENMACHER 1953), the existence of a set of "inhibitory receptors" is certainly possible, so that Threadgold's suggestion must be investigated further. A second possibility is that on photoperiods of 12 hours or more a feedback system may come into action, annulling the initial gonadostimulatory effect. Such a feedback would have to contain, as a component, the slowly responding reaction discussed above, and would not operate from gonadal level, but more likely from the level of the adenohypophysis or from within the brain itself. If a feedback system is involved, it is one with oscillation of considerable magnitude since obviously the gonadotropin output is not maintained at a stable level. Which of these two possibilities actually fits the case can only be determined by further research.

In considering possible causal mechanisms for refractoriness, one should bear in mind that several functions mediated by the hypothalamo-hypophysial system may be photoperiodically controlled. Thus the changes in the function of the neurosecretory system under photoperiodic stimulation may be associated with functional changes in addition to those in gonadotropic function. It is therefore possible that photoperiodically induced alterations in some other endocrine gland, by feed-back effect, may actually cause the development of refractoriness.

Summary

1. In late summer and autumn many temperate-zone birds pass through a refractory period during which testicular growth cannot be induced experimentally with long daily photoperiods. This phenomenon is caused naturally by the long days of spring and early summer. It involves a decrease in release of gonadotropins by the adenohypophysis. Since previous investigations indicate that the release of gonadotropin is mediated by the hypothalamic neurosecretory system, a study of neurosecretory activity during refractoriness is basic for the understanding of this phenomenon.

2. Preliminary morphological studies on refractory birds revealed lateral divisions of neurosecretory cells lying between the supraoptic and paraventricular nuclei regions previously described (OKSCHE *et al.* 1959). Neurosecretory axons from these divisions join the tracts which pass to the median eminence.

3. Birds maintained in outdoor aviaries and killed from May through September showed a pronounced increase of neurosecretory material in the median eminence in late June, when testes regressed. This was accompanied by increases in neurosecretory material in the tracts and lateral division of neurosecretory cells described above, with reduction in sizes of cells and cell nuclei. The amount of neurosecretory material in the supraoptic nucleus was variable, but showed some increase, and the cells, again, decreased strikingly in size.

4. A series of birds was killed in the field from September through December. In the first part of this period there were considerable quantities of neurosecretory material in the median eminence. A pronounced reduction occurred in mid-October shortly before the earliest date at which positive testicular responses to long daily photoperiods have been obtained experimentally. The pathways from the lateral divisions of neurosecretory cells contained material initially (September) and at the end of the period (December) but were empty in late October and early November. The lateral divisions of neurosecretory cells

contained minimal quantities of neurosecretory material at this time; the cells and nuclei appeared larger. Cells of the nucleus supraopticus contained variable amounts of neurosecretory material, but cells and nuclei reached a maximum in size, and presumably in activity, in late October and early November.

5. In studies of photoperiodic testicular response, birds were tested with 15-hour and 20-hour photoperiods at intervals from September through May. A positive response to long daily photoperiods first appeared in late October and early November. In adult birds the rate of response to 15-hour photoperiods was initially low, but increased significantly over November-December. The response of first-year birds (*i.e.* birds hatched during the previous summer) to 15-hour photoperiods proved difficult to interpret. On 20-hour photoperiods, however, the testicular growth rate was initially low, and increased significantly over November, December and January to an apparent maximum for this day length.

6. It is suggested that during refractoriness a factor required for the synthesis and/or release of gonadotropins cannot be transferred from the axons of the median eminence via the portal capillaries to the adenohipophysis in sufficient quantities to cause a testicular response. The inhibition at the level of the median eminence expresses itself histologically as an accumulation of neurosecretory material in the hypothalamus and a reduction in the amount of cytoplasm and the size of cell nuclei in neurosecretory regions. This inhibition sinks below an effective level for complete refractoriness in middle and late October, while days are still long enough to cause some activity of the neurosecretory system. This minor resumption of activity in autumn is probably associated with the autumnal gonadal recrudescence observed in some species. The reduced rates of testicular response obtained experimentally in November-December are attributed to persistent low-level activity of the inhibitory process. The reduced activity of the neurosecretory system after late autumn in wild birds is apparently attributable to the essentially nonstimulating effect of the shorter day lengths of this season.

References

- ASSENMACHER, I.: Recherches sur le contrôle hypothalamique de la fonction gonadotrope préhypophysaire chez le canard. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* **47**, 447—572 (1958).
- BENOIT, J., et I. ASSENMACHER: Action des facteurs externes et plus particulièrement du facteur lumineux sur l'activité sexuelle des oiseaux. II Réunion. des Endocrinologistes de Langue Française, p. 33—80, 1953.
- — Le contrôle hypothalamique de l'activité préhypophysaire gonadotrope. *J. Physiol. (Paris)* **47**, 427—567 (1955).
- — The control by visible radiations of the gonadotropic activity of the duck hypophysis. *Recent Progr. Hormone Res.* **15**, 143—164 (1959).
- — et F. X. WALTER: Réponses du mécanisme gonadostimulant à l'éclairement artificiel et de la préhypophyse aux castrations bilatérale et unilatérale, chez le canard domestique mâle, au cours de la période de régression testiculaire saisonnière. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **144**, 573—577 (1950).
- P. MANDEL, F. X. WALTER et I. ASSENMACHER: Sensibilité testiculaire aux hormones gonadotropes hypophysaires chez le canard domestique, au cours de la période de régression testiculaire saisonnière. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **144**, 1400—1403 (1950).
- BISSONNETTE, T. H.: Studies on the sexual cycle in birds. I. Sexual maturity, its modification and possible control in the European starling (*Sturnus vulgaris*). *Amer. J. Anat.* **45**, 289—305 (1930a).

- BIHRONNETTE, T. H.: Studies on the sexual cycle in birds. III. The normal regressive changes in the testis of the European starling (*Sturnus vulgaris*) from May to November. *Amer. J. Anat.* **46**, 477—497 (1930b).
- BLANCHARD, B. D.: The white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys*) of the Pacific seaboard: environment and annual cycle. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **46**, 1—178 (1941).
- , and M. M. ERICKSON: The cycle in the Gambel sparrow. *Univ. Calif. Publ. Zool.* **47**, 255—318 (1949).
- CLARK, L. B., S. L. LEONARD and G. BUMP: Light and the sexual cycle of game birds. *Science* **85**, 339—340 (1937).
- FARNER, D. S.: Photoperiodism in animals with special reference to avian testicular cycles. In: *Photobiology. Oregon State College Biology Colloquium*, p. 17—29, 1958.
- Photoperiodic control of annual gonadal cycles in birds. In: *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. Amer. Ass. Adv. Sci. Publ.* **55**, 717—750 (1959).
- Comparative physiology: Photoperiodicity. *Ann. Rev. Physiol.* **23**, 71—96 (1961).
- , and L. R. MEWALDT: The natural termination of the refractory period in the white-crowned sparrow. *Condor* **57**, 112—116 (1955).
- A. OKSCHE, H. KOBAYASHI and D. F. LAWS: Hypothalamic neurosecretion in the photoperiodic testicular response in birds. *Anat. Rec.* **137**, 354 (1960).
- , and A. C. WILSON: A quantitative examination of testicular growth in the white-crowned sparrow. *Biol. Bull.* **113**, 254—267 (1957).
- GRIGNON, G.: Développement du complexe hypothalamo-hypophysaire chez l'embryon de poulet. Nancy: Société d'impressions typographiques 1956.
- HERTL, M.: Das Verhalten einiger Hypothalamuskern der weißen Maus während verschiedener Entwicklungs- und Funktionsphasen des weiblichen Genitalapparates. *Z. Zellforsch.* **42**, 481—507 (1955).
- KOBAYASHI, H., and D. S. FARNER: The effect of photoperiodic stimulation on phosphatase activity in the hypothalamo-hypophysial system of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. *Z. Zellforsch.* **53**, 1—24 (1960).
- LAWS, D. F.: Hypothalamic neurosecretion in the refractory and postrefractory periods and its relation to the rate of photoperiodically induced testicular growth in *Zonotrichia leucophrys gambelii*. Doctoral thesis. Washington State University 1960.
- LEGAT, H.: Contribution à l'étude morphologique et expérimentale du système hypothalamo-neurohypophysaire de la Poule Rhode-Island. Thèse, Louvain. Nancy: S. I. T. 1959.
- LOFTS, B., and A. J. MARSHALL: An investigation of the refractory period of reproduction in male birds. *J. Endocr.* **17**, 91—98 (1958).
- MARSHALL, A. J.: The interstitial cycle in relation to autumn and winter sexual behaviour in birds. *Proc. Zool. Soc. Lond.* **121**, 727—740 (1952).
- MILLER, A. H.: Potentiality for testicular recrudescence during the annual refractory period of the golden-crowned sparrow. *Science* **109**, 546 (1949).
- MOOD, A. McF.: Introduction to the theory of statistics. London and New York: McGraw Hill 1950.
- OKSCHE, A.: Optico-vegetative regulatory mechanisms of the diencephalon. Paper at the VIIth International Congress of Anatomists, New York 1960. *Anat. Anz.* **108**, 320—329, (1960).
- Die Beteiligung der Neuroglia an sekretorischen Leistungen und Stoffwechselvorgängen des Zentralnervensystems unter besonderer Berücksichtigung des Subkommissuralorgans. *Habil.-Diss. Medizinische Fakultät der Universität Marburg a.d. Lahn* 1960 (in press).
- D. F. LAWS, F. I. KAMEMOTO and D. S. FARNER: The hypothalamo-hypophysial neurosecretory system of the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambelii*. *Z. Zellforsch.* **51**, 1—42 (1959).
- RILEY, G. M.: Light regulation of sexual activity in the male sparrow (*Passer domesticus*). *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* **34**, 331—332 (1936).
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*. München: R. Oldenburg 1948.
- SCHILDMACHER, H.: Über die künstliche Aktivierung der Hoden einiger Vogelarten im Herbst durch Belichtung und Vorderlappenhormone. *Biol. Zbl.* **59**, 653—657 (1939).
- SHANK, M.: The natural termination of the refractory period in the slate-colored junco and in the white-throated sparrow. *Auk* **76**, 44—54 (1959).

- THREADGOLD, L. T.: The annual gonad cycle of the male jackdaw, *Corvus monedula*; quantitative aspects. *Cellule* **58**, 45—54 (1956).
- Testicular response of the house sparrow, *Passer domesticus*, to short photoperiods and low intensities. *Physiol. Zool.* **33**, 190—205 (1960).
- VAUGIEN, L.: Influence de l'obscurité temporaire sur la durée de la phase réfractaire du cycle sexuel du moineau domestique. *Bull. biol. France Belg.* **88**, 294—309 (1954).
- Sur les réactions testiculaires du jeune moineau domestique illuminé à diverses époques de la mauvaise saison. *Bull. biol. France Belg.* **89**, 218—244 (1955).
- Influence de la durée du jour sur l'activité sexuelle du chardonneret mâle. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **242**, 2253—2254 (1956).
- WINGSTRAND, K. G.: The structure and development of the avian pituitary. Lund: Gleerup 1951.
- WOLFSON, A.: Day length, migration, and breeding cycles in birds. *Sci. Monthly* **74**, 191—200 (1952a).
- The occurrence and regulation of the refractory period in the gonadal and fat cycles of the junco. *J. exp. Zool.* **121**, 311—326 (1952b).
- Regulation of refractory period in the photoperiodic responses of the white-throated sparrow. *J. exp. Zool.* **139**, 349—379 (1958).
- The role of light and darkness in regulation of refractory period in gonadal and fat cycles of migratory birds. *Physiol. Zool.* **32**, 160—176 (1959a).
- The role of light and darkness in the regulation of spring migration and reproductive cycles in birds. In: *Photoperiodism and related phenomena in plants and animals*. Amer. Ass. Advanc. Sci. Publ. **55**, 679—716 (1959b).

Dr. DONALD F. LAWS,
Dept. of Zoology, Duke University, Durham, North Carolina, U.S.A.

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Marburg a. d. Lahn
(Direktor: Prof. Dr. K. NIESSING)

DER HISTOCHEMISCH NACHWEISBARE GLYKOGENAUFBAU UND
-ABBAU IN DEN ASTROCYTEN UND EPENDYMZELLEN ALS BEISPIEL
EINER FUNKTIONSABHÄNGIGEN STOFFWECHSELAKTIVITÄT
DER NEUROGLIA*

Von

A. OKSCHE

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Januar 1961)

Einleitung und Fragestellung

Die Betrachtungen zum gegenwärtigen Stand der Neurogliaforschung (NIES-SING 1957, WINDLE u. a. 1958, KOREY u. a. 1959, FLEISCHHAUER 1960b) weisen ausdrücklich darauf hin, daß die aktuelle Forschungsrichtung die Cytodynamik der Gliazelle, insbesondere den Stoffwechsel, den Stofftransport, die Speicherung und die Sekretion zum Gegenstand hat (vgl. auch PENFIELD 1932, HORTEGA 1932, BIELSCHOWSKY 1935, K. FR. BAUER 1953, GLEES 1955). Die Annahme dieser Leistungen liegt nahe, weil die Glia über auffallend enge räumliche Beziehungen sowohl zu den Ganglienzellen als auch zum Gefäßapparat verfügt. Diese räumliche Zuordnung ist so eigentümlich, daß sie bereits seit der Entdeckung der Neuroglia (VIRCHOW 1846) im Mittelpunkt des Interesses gestanden hat.

Daß diese Nachbarschaft wirklich dem Stoffaustausch zwischen Ganglien- und Gliazellen dient, kann nur experimentell bewiesen werden. Dafür müssen aber neue morphologische und biochemische Grundlagen erarbeitet werden, die die Cytodynamik beider Zellarten berücksichtigen. Im Vordergrund der modernen morphologischen Gliaforschung steht neben der elektronenmikroskopischen und histochemischen Analyse die unmittelbare Beobachtung der Lebensäußerungen der Gliazelle in der Gewebekultur. Über diese Fortschritte wird ausführlich in der Monographie von WINDLE (1958) berichtet, die unter anderen Aufsätze von DEMPSEY und LUSE, HARTMANN, PALAY (Elektronenmikroskopie, vgl. dazu HORSTMANN und MEVES 1959), LUMSDEN, POMERAT (Gewebekultur, vgl. dazu CANTI, BLAND und RUSSELL 1935, LUMSDEN und POMERAT 1951, POMERAT 1952, HILD 1954a, b, 1957a, b, c, 1959, NIESSING 1957, 1958, OKAMOTO 1957, MURRAY 1959) KOREY, POPE, TSCHIRGI (Stoffwechsel) und ADAMS (pathologische Reaktionen) enthält.

Es hat sich sehr deutlich gezeigt, daß zur Klärung der Funktion der Neuroglia eine enge Zusammenarbeit verschiedener Forschungsrichtungen erforderlich ist,

* Durchgeführt mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Marburger Universitätsbund. — Mit wertvollem Material haben mich die Herren Prof. Dr. K. NIESSING, Marburg, Prof. Dr. H. W. PIA, Gießen, Prof. Dr. H. JACOB, Marburg, und Dr. E. S. G. SCHMIDT, z. Zt. Buenos Aires, unterstützt. — Für technische Mitarbeit habe ich den Herren cand. med. E. BÖRNER und cand. med. F. WOLFF, für elektronenmikroskopische Präparate und Aufnahmen Herrn Dr. W. VOGEL und Fr. B. SCHÜLER, für Mikroaufnahmen Fr. E. HAUBERG, Marburg, zu danken.

die sich auf diesem Gebiet erst in der letzten Zeit anbahnt. Die morphologische Arbeitsweise hat für die Gliaforschung einige wesentliche Vorzüge. Elektrophysiologisch wird die Aktivität der Gliazellen *in situ* nicht für sich erfaßt (s. Literatur in GLEES 1958), wenn auch in der Gewebekultur von einzeln liegenden Astrocyten Aktionspotentiale abgeleitet werden konnten (HILD, CHANG und TASAKI 1958). Auch im Gewebehomogenisat oder Ultrazentrifugat, die der biochemischen Analyse dienen, lassen sich, trotz wesentlicher technischer Fortschritte, die Ganglienzellen und die verschiedenen Zelltypen der Glia nicht einwandfrei trennen (KOREY 1958, KOREY, ORCHEN und BROTZ 1958, POPE 1958). Völlig reine Glia eines bestimmten Typs kann in einer für umfassende biochemische Analyse ausreichenden Menge auch nicht aus der Gewebekultur gewonnen werden (POPE 1958, WOLFGRAH und ROSE 1959). Tumoren, die aus einer einzigen Neurogliaart bestehen, enthalten wiederum Zellen, die man nicht den normalen Elementen gleichsetzen kann. Das Äquivalentbild des neurohistologischen Schnittpräparates gestattet dagegen nicht nur eine getrennte Betrachtung der verschiedenen Zelltypen, sondern erlaubt auch noch eine Beurteilung des ganzen komplizierten Strukturgefüges, das bei der chemischen Aufarbeitung unweigerlich zerstört wird. Im konservierten Material können allerdings Artefakte vorkommen, deren Entstehung von POMERAT (1958) untersucht wurde. Außerdem können unsere heutigen histochemischen Methoden die biochemischen Analyseverfahren nicht ersetzen. So hat jede Arbeitsweise für die Gliaforschung ihre Vorteile und ihre Grenzen.

Der Weg einer funktionellen Strukturanalyse der Neuroglia im Schnittpräparat wurde von NIESSING (1950, 1952, 1953/54) und KULENKAMPFF (1952) beschritten, die im Versuchsmaterial die Formwandlung und Lageänderung der Astrocyten und Oligodendrocyten beobachten konnten. Diese Untersuchungen umfassen auch Reaktionen der Ependymzellen (KULENKAMPFF 1958, KULENKAMPFF und KOLB 1957, 1960, KULENKAMPFF und KRBEK 1959) und der Hortega-Zellen (NIESSING 1952). Nach NIESSING sprechen die Gliazellen der Maus auf Wasserentzug, Krampfgifte, Narkotica, Analeptica und einige Hormone (Östradiol) an. KULENKAMPFF (1952) fand im Rückenmark der Maus unter physiologischer Tätigkeit eine Zunahme der Oligodendrocyten, die unmittelbar den motorischen Vorderhornzellen anliegen (vgl. auch KULENKAMPFF und WÜSTENFELD 1954).

Bei solchen Änderungen der räumlichen Beziehungen der Oligodendrocyten und Astrocyten zu den Ganglienzellen muß mit histochemischen Methoden nach Stoffen gefahndet werden, die einen Hinweis auf Stoffaustauschvorgänge geben könnten. Histochemisch verfolgt wurden Eiweiße, Lipide und Kohlenhydrate.

Eiweiße und Lipide lassen sich am leichtesten in Oligodendrocyten nachweisen, wenn auch Astrocyten, insbesondere die reaktiv proliferierten Formen Ribonucleoproteidgranula (PALAY 1958) enthalten. Das Vorkommen von Eiweiß- und Lipidgranula in den Oligodendrocyten wird schon seit HORTEGA (s. BIELSCHOWSKY 1935) mit der Markscheidenbildung in Verbindung gebracht (ROBACK und SCHERER 1935, WINDLE u.a. 1958, LUSE 1959, s. KOREY 1959, vgl. auch die Kritik von HILD 1959). KULENKAMPFF (1952) und KRBEK (1955) untersuchten die Ribonucleoproteidgranula der satellitären Oligodendrocyten im Zusammenhang mit der Frage nach der Regeneration der Nissl-Substanz der Ganglienzellen. Der aktive RNS- und Proteinstoffwechsel der Oligodendrocyten konnte auch mit Radioisotopen (C^{14} , S^{35}) gesichert werden (KOENIG 1959, WAELSCH 1959).

Der histochemische Kohlenhydratnachweis war hauptsächlich in den Astrocyten erfolgreich. Astrocyten können in der Gewebekultur ein Mucoproteid oder ein Mucopolysaccharid bilden (LUMSDEN 1958). Das Vorkommen von Glykogen in Astrocyten und Ependymzellen wurde auf vergleichender und funktioneller Basis von OKSCHE (1958) untersucht (vgl. CASAMAJOR 1909, SCHABADASCH 1939, SHIMIZU und KUMAMOTO 1952, SHIMIZU 1955, J. ARIËNS KAPPERS 1956, KUBO 1956a, b, c, FRIEDE 1955, 1957).

Die Astrocyten verdienen wegen ihrer ausgeprägten Beziehungen zu den Blutgefäßen und zu den Ganglienzellen eine besondere Beachtung. Die Angaben über die Enzyme und über die Stoffwechselaktivität der Astrocyten sind noch sehr lückenhaft. POPE (1958) schreibt: „... astrocytes can be considered to have a fairly low rate of oxidative metabolism“. Darin besteht ein Gegensatz zu den Oligodendrocyten. Der Gehalt der Astrocyten an oxydativen Enzymen ist gering (s. POPE). Enzyme der Atmungskette (Cytochromoxydase) konnten in Astrocyten nur in geringer Menge nachgewiesen werden. Astrocytome zeichnen sich durch einen sehr geringen Sauerstoffverbrauch aus. Allerdings gelang WOLFGRAH und ROSE (1959) der histochemische Nachweis von Bernsteinsäure-, Äpfelsäure-, Milchsäure- und α -Glycerophosphat-Dehydrogenase im Cytoplasma (Mitochondrien) von Astrocyten (auch Oligodendrocyten und Hortege-Zellen). Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase scheint hauptsächlich in Oligodendrocyten vorzukommen (LOWRY 1955). Über andere Enzyme der Gliazellen, sowie Mitochondrien siehe WINDLE u.a. (1958).

Da das Kohlenhydrat den wesentlichen Brennstoff der Ganglienzelle darstellt (LEUTHARDT 1959) und die unter funktionellen Bedingungen wechselnde Glykogenmenge einen gewissen Einblick in den Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle gestattet, glauben wir in dem histochemischen, alle Strukturen des ZNS umfassenden Glykogennachweis einen günstigen Modellfall zur Erforschung der physiologischen Wechselbeziehungen zwischen Ganglien- und Gliazellen zu haben. Eine besondere Aufmerksamkeit wird dabei auf das Gefälle in der Glykogenlokalisation gerichtet sein, da dieses einen Hinweis auf die Richtung des Stoffstromes zu geben vermag. Die Voraussetzung für einen aktiven Stofftransport könnte in den peripherwärts gerichteten Schüttelbewegungen des Astrocyten-cytoplasmas gegeben sein (HILD 1954a, b, NIESSING 1958, POMERAT 1958, LUMSDEN 1958), die granuläre Einschlüsse bis in die feinsten Verzweigungen transportieren, wo es zur Stoffabgabe in das Medium der Gewebekultur kommen kann (LUMSDEN).

Langsame Kontraktionen der Astrocyten lassen sich in der Gewebekultur durch elektrische Reizung einzelner Zellen auslösen (CHANG und HILD 1959, vgl. HILD, CHANG und TASAKI 1958).

OKSCHE (1958) hat auf die stark wechselnde Glykogenmenge in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Strukturbereich („Neuropil“) hingewiesen, der aus den feinsten Verzweigungen der Ganglien- und Gliazellen besteht. In diesen mitochondrienhaltigen Zellstrukturen sind wesentliche Stoffaustauschvorgänge denkbar. (Zur Frage der extrazellulären Räume und zum Grundsubstanzproblem s. FARQUHAR und HARTMANN 1957, NIESSING und VOGELL 1957, 1960, HORSTMANN 1957a, 1958/59, HORSTMANN und MEVES 1959, DEMPSEY u. a. in WINDLE 1958, HAGER 1959).

In Fortführung der eigenen histochemischen Glykogenstudien am Wirbeltiergehirn (OKSCHE 1958) schien es besonders wesentlich, die Glykogenmenge und -verteilung in einem physiologischen Ruhezustand des ZNS zu erfassen, um sie dann mit den Verhältnissen in einer Aktivitätsphase zu vergleichen. Das Gehirn (Cortex, Medulla) von Siebenschläfer und Igel enthält im Winterschlaf wesentlich größere Mengen Glykogen als im Sommer (OKSCHE 1958). NIESSING (1957) konnte im Winterschlaf kaum noch neuronale Glia-satelliten nachweisen. Die Glia schien ihre Beziehungen zu den Ganglienzellen gelöst zu haben. Dagegen war die Zahl der vaskulären Satelliten (Hortega-Zellen) erhöht. Durch den histochemischen Glykogennachweis werden die Oligodendrocyten und die Hortega-Zellen nur mangelhaft dargestellt; die Astrocyten und die von HORSTMANN (1954) als Tanycyten bezeichneten ependymalen Gliazellen stehen im Vordergrund dieser Studie.

Da der physiologische Winterschlaf durch seine Regulationsmechanismen eine Sonderstellung einnimmt, erschien es ratsam, den histochemischen Glykogennachweis auch nach einem längeren Narkoseschlaf durchzuführen. Weitere Fragen betrafen das Verhalten der reaktiv proliferierten Astrocytenformen in der Nachbarschaft von Hirnwunden und Tumoren. Besondere Aufmerksamkeit wurde den Tanycyten der niederen Wirbeltiere gewidmet, die funktionell wahrscheinlich den Astrocyten der höheren Formen entsprechen und Stoffstraßen darstellen, die ins Innere der Hirnsubstanz führen (OKSCHE 1958). Es wurde versucht, die besonders langen und starken Fortsätze dieser Zellen, deren Ausläufer in dem nur elektronenmikroskopisch auflösbaren Strukturbereich verdämmern, operativ zu unterbrechen.

Material und Methodik

Das Untersuchungsgut umfaßt Gewebsblöcke aus 42 Gehirnen:

Amphibia, Anura: *Rana temporaria* L. (16).

Mammalia, Insectivora: *Erinaceus europaeus* L. (2).

Rodentia: *Glis glis* (L.) [*Myoxus glis* L.] (9), *Rattus rattus* (L.) (13).

Homo: (2).

Ausführliche Angaben über die Versuche und die untersuchten Regionen des ZNS werden in den entsprechenden Kapiteln gegeben.

Materialgewinnung. Das Tiermaterial wurde, soweit möglich, in der natürlichen Umwelt gefangen oder unter Bedingungen gehalten, die weitgehend den natürlichen entsprechen. Über die Haltung der Frösche s. LIEBER (1954), OKSCHE (1958), der winterschlafenden Säuger — NIESSING (1956), OKSCHE (1958). Das menschliche Material stammt aus Gehirnoperationen (Doz. Dr. H. W. PIA). Die Präparation wurde stets schnellstens durchgeführt und das Material noch lebenswarm (in den meisten Fällen 1—3 min nach der Dekapitierung bzw. Exzision) konserviert.

Fixierung. Gehirn-, Leber- und Muskelstückchen wurden in den Gemischen von ROSSMAN, sowie LISON und VOKAER bei 0° bis +4°C für 24 Std konserviert. Für Säuger empfiehlt sich die erste, für Anuren die zweite Fixierungsflüssigkeit. Auswaschen in 96% Alkohol.

Einbettung. Über Cedernholzöl in Paraffin.

Schnittdicke. 10 μ . (Über die Bedeutung der Schnittdicke für die Auszählung der Gliazellen vgl. CAMMERMEYER, p. 61 in WINDLE 1958). Von den meisten Objekten wurden Auszugsserien hergestellt. Dadurch war die parallele Anwendung von verschiedenen histologischen und histochemischen Verfahren möglich.

Histochemischer Glykogennachweis. Bleitetraacetat-Schiff-Methode (SHIMIZU und KUMAMOTO 1952), Perjodsäure-Schiff-Methode nach McMANUS und CASON (1950) (1%ige wäßrige Perjodsäurelösung) oder ein kombiniertes Chromsäure-Perjodsäure-Schiff-Verfahren (s. OKSCHE 1958). Am Säugermaterial gelangte ausschließlich die Bleitetraacetat-Methode

zur Anwendung. Vergleichsobjekte wurden stets gleichzeitig der Einwirkung der verschiedenen Reagentien ausgesetzt, nach Möglichkeit auf einem Objektträger untergebracht, der zur Kontrolle auch noch ein Leberstückchen enthielt. Der Diastase-Test wurde regelmäßig an benachbarten Schnitten der Auszugsserien durchgeführt. Digerierung mit einer 1%igen Lösung von Diastase (*Merck*, hochgereinigt) in 1%iger NaCl-Lösung für 1 Std bei 37°C (PEARSE 1953) oder mit Saliva (1 Std/37°C). Das fermentfreie Lösungsmittel war auf das Glykogen ohne Wirkung. Kernfärbung mit saurem Hämalaun nach MAYER. In einzelnen Fällen Anwendung einer modifizierten Perjodsäure-Leukofuchsinmethode (Reagens nach GRAUMANN 1953). Zur Methodik des histochemischen Glykogennachweises vgl. GRAUMANN (1957, 1958), GRAUMANN und CLAUS (1959).

Elektronenmikroskopische Untersuchung. Fixierung in isotonischer, gepufferter Osmiumtetroxydlösung (pH 7,2) für 4—12 Std bei etwa 4°C. Einbettung in üblicher Weise in ein Gemisch von 8 : 2 Butyl-Methylmethacrylat. Die mit Glasmessern hergestellten Dünnschnitte (Mikrotom mit thermischem Vorschub nach VOGEL) wurden bei einer Spannung von 60 kV mit einem Siemens-Elektronenmikroskop Typ ÜM 100b mit Stigmator betrachtet, die Aufnahmen bei einer 7200fachen elektronenmikroskopischen Vergrößerung gemacht.

Befunde

I. Der Glykogennachweis im Gehirn winterschlafender und wacher Tiere

1. Siebenschläfer (*Glis glis* (L.) [*Myoxus glis* L.]

Untersuchungsgut.

Tabelle 1

Tier Nr.	Zustand	Datum	Ge-schlecht	Gewicht g	t °C Bauchhöhle
1	Tiefer Winterschlaf (mindestens 8—10 Tage)	18. 1. 57	♂	150	6
2	Tiefer Winterschlaf (mindestens 8—10 Tage)	18. 1. 57	♂	150	6
3	Tiefer Winterschlaf (mindestens 8—10 Tage)	18. 1. 57	♂	135	11
4	Kurz nach dem Tod im tiefen Winterschlaf	14. 3. 58	♂	109	1,5 ¹
5	Schlafzustand	21. 2. 59	♂	105	16,5
6	Erwacht	21. 2. 59	♂	155	21
7	Wach, nach 10tägigem Erwärmen ²	3. 3. 59	♂	138	35 ³
8	Wach	15. 3. 57	♂	169	35
9	Wach, Sommertier	24. 6. 58	♂	122	32,5

¹ Postmortal ausgekühlt.

² Für 10 Tage (21. 2. — 3. 3.) im warmen Raum (+ 18°C) gehalten.

³ Rektale Temperatur am 21. 2.: 32°.

Von den Tieren Nr. 1—3 und 8 wurden einige eng begrenzte Hirnareale bereits für eine frühere Untersuchung (OKSCH 1958) herangezogen. Von diesen Gehirnen habe ich jetzt neue Schnittserien (andere, noch nicht untersuchte Hirnteile) angefertigt, die mit anderer Methodik aufgearbeitet wurden.

Methode. Glykogennachweis: Bleitetraacetat-Schiff-Methode mit Diastase- und Saliva-Kontrolle im Parallelschnitt. Kernfärbung: saures Hämalaun.

Untersuchte Regionen. Von allen Siebenschläfern — korrespondierende Teile der Brücke bzw. der Medulla oblongata, des Kleinhirns und des Großhirns (Temporo-Parietallappen, meist mit dem Ammonshorn). Von den Siebenschläfern Nr. 5—7 außerdem noch das Cervicalmark. In allen Fällen mindestens der Plexus chorioideus eines Seitenventrikels, z. T. auch der Plexus chor. ventr. IV. Der Glykogennachweis wurde bei allen Tieren außerdem noch an der Leber durchgeführt. An einigen Objekten wurde zusätzlich der Musculus gastrocnemius untersucht.

Befunde: *Pons und Medulla oblongata.* Bei allen tief schlafenden Tieren fand sich sehr viel Glykogen in den großen Ganglienzellen und den Gliazellen, die diesen satellitär zugeordnet sind, insbesondere in den Astrocyten, was an den glykogengefüllten Endfüßen im Bereich der Membranae limitantes gliae zu erkennen war.

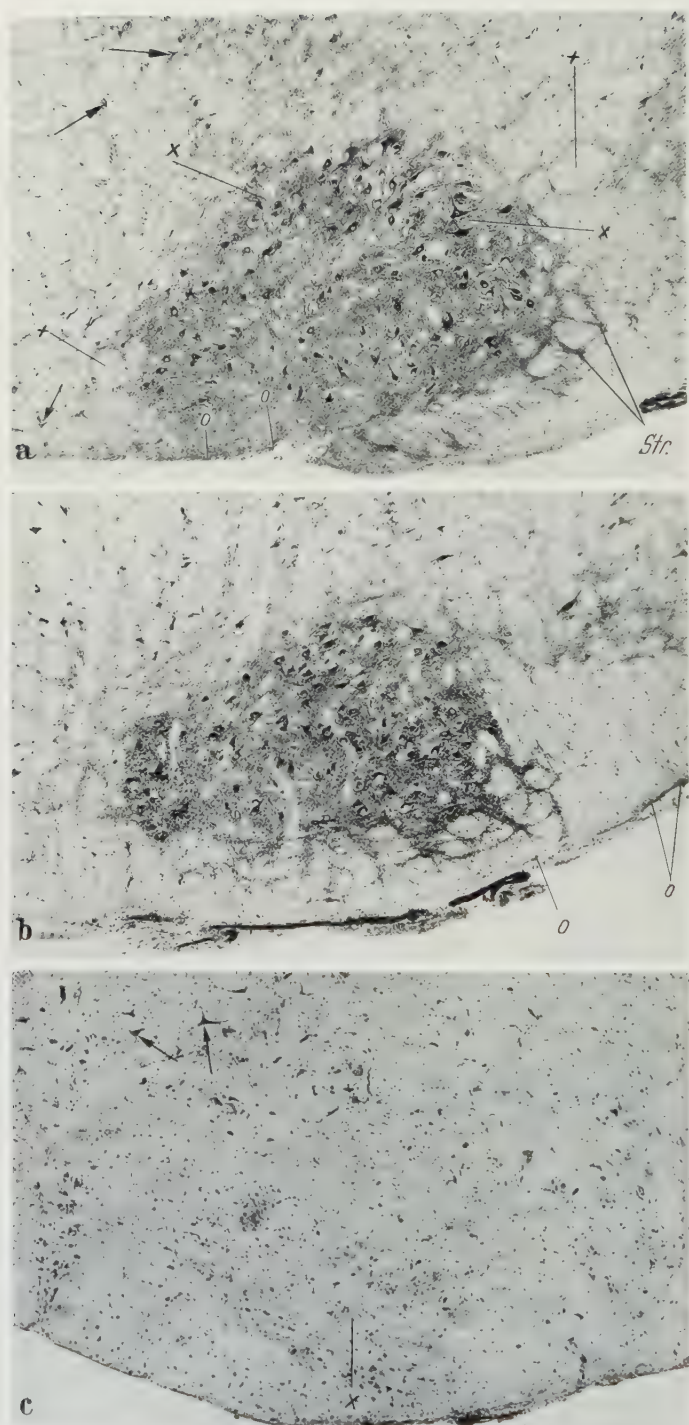


Abb. 1a—c. Glykogendarstellung in der Medulla oblongata des Siebenschläfers (*Glis glis*). Übergang vom Schlaf- zum Wachzustand. Korrespondierende basale Abschnitte mit dem Nucl. VII. Frontalschnitte. Rossman fix. (0 °C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. Vergr.

Viel Glykogen enthielt auch der zu solchen Hirnkernen gehörige lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbare Bereich (Abb. 1a, b). Dagegen waren die Fasermassen der *Formatio reticularis grisea* relativ glykogenarm. Bei wachen Frühjahrs- und Sommertieren wies die *Medulla oblongata* mit Ausnahme der *Area postrema* kein Glykogen auf. Die Siebenschläfer Nr. 5 und 6 gaben die Möglichkeit, ein noch oberflächlich schlafendes und ein ganz erwachtes Tier zu vergleichen. Siebenschläfer Nr. 5 (21. 2., 16,5° C) zeigte eine diffus positive Glykogen-Reaktion im ganzen Schnitt, mit besonderer Betonung der großzelligen Kerngebiete (Abb. 1a). Durch die intensive Farbtönung ließ sich auch der jeweils einem Kerngebiet zugeordnete Bereich der feinsten Zellaufzweigungen genau verfolgen. Dieses Gebiet ging an der Peripherie weit über das von den Perikaryen eingenommene Areal hinaus und verdämmerte allmählich in die nur schwach gefärbte Umgebung (Abb. 1a). Jedes glykogenhaltige Kerngebiet war dadurch noch durch einen äußeren, in der Farbtintensität entsprechenden Hof gezeichnet. Die Glykogenmenge, die beim Siebenschläfer Nr. 5 an der *Membr. limit. gliae superfic. (o)* dargestellt wurde, unterschied sich nicht wesentlich von dem Zustand im tiefsten Winterschlaf (Januar). Trotz der glykogenreichen Umgebung der *Membr. limit. gliae superfic.* konnte an der *Membr. limit. gliae perivasc.* kein Glykogen nachgewiesen werden.

Das histochemische Glykogenpräparat gestattet keine detaillierte Strukturanalyse der Grenzmembranen des ZNS, die von HELD genau definiert worden sind. An den Stellen dieser Studie, wo die Glykogenlokalisation mit *Membrana limitans gliae superficialis* oder *perivascularis* angegeben wird, ist diese Ortsangabe so zu verstehen, daß die Glykogenkörnchen in einer verschieden breiten Zone einwärts von der ursprünglichen ektodermalen Grenzmembran liegen. Glykogenhaltige Astrocytenendfüße ergeben das Bild eines schmalen elektiv gefärbten Randsaumes. Die breiten Glykogenwälle werden dann sichtbar, wenn Glykogenkörnchen außer den Endfüßen auch noch die distalen Abschnitte des Astrocytenfortsatzes markieren.

Das Tier Nr. 6 (21. 2.; 21° C) zeigte im Vergleich zum Tier Nr. 5 einen gewissen Rückgang der histochemisch erfaßbaren Glykogenmenge (Abb. 1b). Beim Siebenschläfer Nr. 7 (3. 3.; 35° C), der für 10 Tage bei Zimmerwärme gehalten und gefüttert worden war, konnten zwar noch glykogenhaltige Perikaryen der Ganglienzellen nachgewiesen werden, aber überhaupt kein Glykogen in dem submikroskopischen Gefüge der allerfeinsten Zellausläufer (Abb. 1c). Im ganzen war also ein starker Rückgang der Glykogenmenge zu verzeichnen.

Cerebellum. Zur Illustrierung des Schlaf- und Wachzustandes genügt schon die Gegenüberstellung der Siebenschläfer Nr. 5 und 7. Am 21. 2. (Nr. 5) gab das *Stratum moleculare* eine diffus positive Glykogenreaktion. Auf einem homogen gefärbten Untergrund strebten intensiv gefärbte Gliafortsätze zur *Membr. limit.*

60fach. a) 21. 2., Tier Nr. 5. Schlafzustand, jedoch kein tiefer Winterschlaf. Das Kerngebiet sticht durch seinen Glykogenreichtum (dunkel) deutlich hervor, seine großen Ganglienzellen sind mit Glykogen gefüllt. Starke Farbreaktion in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich (x), der unter anderem das Kerngebiet hofartig umgibt und strangartige Ausläufer (*Str.*) entsendet. o Glykogenreiche Stellen an der *Membr. limit. gliae superfic.* ↑ Glykogenhaltige Faserstränge der *Formatio reticularis grisea* mit glykogenreichen Ganglienzellen. + Glykogenfreie Faserbündel (Querschnitte longitudinal verlaufender Fasersysteme). b) 21. 2., Tier Nr. 6. Vor kurzem erwacht, noch etwas benommen. Im Vergleich zur Abb. 1a weniger starke Glykogenzeichnung im lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich. Die Perikaryen der Ganglienzellen unverändert glykogenreich. Faserstränge der *Formatio reticularis grisea* nicht mehr so intensiv gefärbt. o Glykogenreiche Stellen an der *Membr. limit. gliae superfic.* c) 3. 3. Tier Nr. 7. Am 21. 2. wach, anschließend für 10 Tage weiter erwärmt und gefüttert. Das glykogenfreie Kerngebiet (x) kaum zu erkennen (nur die Zellkerne mit Hämalan gefärbt — dunkle Punkte). Die Felderung nicht sichtbar, da alle Fasersysteme glykogenfrei. Bei ↑ vereinzelte glykogenhaltige Ganglienzellen

gliae superfic. Dagegen lag an der Membr. limit. gliae perivasc. kein Glykogenbefund vor. Das Stratum granulosum enthielt glykogenhaltige Zellen. Purkinje-Zellen waren nur zum Teil glykogenreich. Am 3. 3. (Nr. 7) fiel die Glykogen-Reaktion im Str. moleculare fast negativ, im Str. granulosum nur schwach aus. Die Purkinje-Zellen traten nicht mehr durch elektive Glykogen-Darstellung hervor. Das Kleinhirn wacher *Sommertiere* war histochemisch völlig glykogenfrei.

Halbmark. Nr. 5, 21. 2., 16,5° C, noch schlafendes Tier: Weiße Substanz völlig farblos, graue Substanz intensiv rot durch positiven Glykogennachweis. Nur in den motorischen Vorderhornzellen enthält der Zelleib Glykogen, z. T. sogar in großen Mengen. Membr. limit. gliae superfic. ohne elektive Darstellung. Nr. 6, 21. 2., 21° C, waches Tier: Graue Substanz blasser als bei Nr. 5, motorische Vorderhornzellen glykogenärmer. Nr. 7, 3. 3., 35° C, waches, gefüttertes Tier: Graue Substanz völlig glykogenfrei.

Großhirnrinde. In den Ganglienzellen auch im tiefen Winterschlaf (18. 1., 14. 3.) nur ganz vereinzelt kleine Glykogenkörnchen. Dafür sehr glykogenreiche Gliazellen, in erster Linie Astrocyten, z. T. aber auch Oligodendrocyten. Außerordentlich glykogenreiche Astrocytenendfüße an der Membr. limit. gliae superfic. und perivasc.

Nach BAIRATI (1958) gibt es in der Kleinhirn- und Großhirnrinde keine ausgeprägten Membranae limitantes gliae. Vereinzelt kurze protoplasmatische Gliafortsätze liegen hier in einer dünnen amorphen Lage eingebettet. Dagegen werden die Arteriolen und Venulen des Rückenmarks und der Medulla, die einen Durchmesser von 30—50 μ aufweisen, von einer Membrana limitans gliae umgeben.

Intensive Färbung des ganzen Gehirnschnittes durch große Glykogenmengen im molekularen Bereich des Rindengraus. Bei den Tieren Nr. 5—7: In der Großhirnrinde des Siebenschläfers Nr. 5 (21. 2.) liegt trotz des nur oberflächlichen Schlafes, ähnlich wie in der Medulla oblongata, ein Zustand vor, der dem Befund im tiefen Winterschlaf in jeder Beziehung entspricht (vielleicht nur eine geringfügige Glykogenabnahme in den Astrocytenendfüßen der Membranae limitantes gliae). Bei dem wachen Siebenschläfer Nr. 6 (21. 2.) dagegen ein Rückgang der Reaktionsintensität, vor allen Dingen in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich und in den Astrocytenendfüßen, woraus ein bedeutend zarterer und schwächerer Farbton des ganzen Schnittes resultiert. Bei Nr. 7 (3. 3.) ein weiterer Rückgang der Farbintensität im ganzen Schnitt bis zu einem zarten Rosa. Nur noch vereinzelt Glykogengranula in den Astrocytenendfüßen an der Membr. limit. gliae superfic. und perivasc. In den Gehirnen der wachen *Sommertiere* der ganze Großhirnschnitt völlig farblos; nur die Astrocytenendfüße an den Membranae limitantes gliae können noch zuweilen kleine Glykogenkörnchen enthalten.

Ammonshorn. Im Gegensatz zu anderen Abschnitten des Großhirns wurde das Ammonshorn der Siebenschläfer Nr. 6—7 durch das Erwachen und den Körpertemperaturanstieg viel weniger betroffen. Besonders viel Glykogen enthielten hier die perivascularen Astrocytenendfüße. Beim Sommertier war nur ein gradueller Rückgang der Glykogenmenge an der Membr. limit. gliae perivasc. zu verzeichnen. Der lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbare Bereich enthielt nach wie vor größere Glykogenmengen. Dieser Befund enthält einen weiteren Hinweis auf die histochemischen Eigenarten des Ammonshorns, die FLEISCHHAUER (1959) hervorgehoben hat. Erwähnenswert, daß die Glia sich hier besonders gut mit den Silbermethoden darstellen läßt (vgl. NIESSING).

Plexus chorioidei. Im tiefen Winterschlaf außerordentlich glykogenreich (OKSCHE 1958), im Sommer völlig glykogenfrei. Von den Siebenschläfern Nr. 5—7,

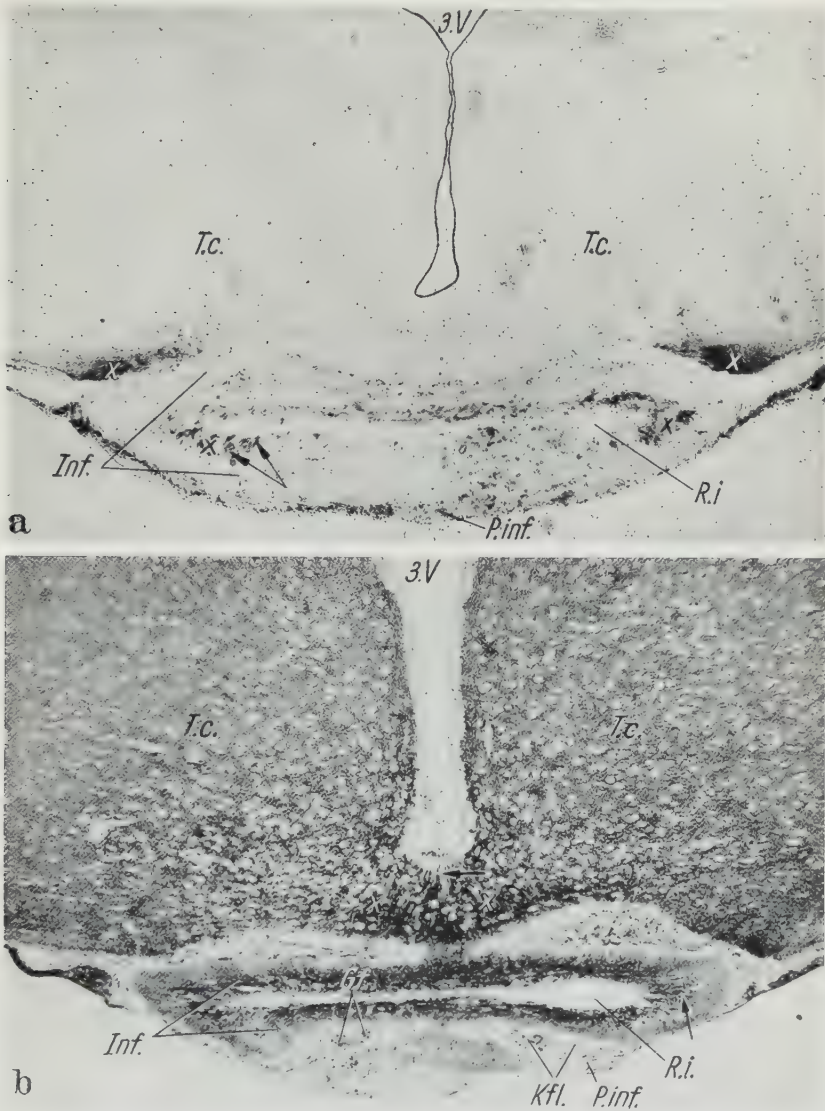


Abb. 2 a u. b. Glykogengehalt des Hypothalamus im Sommer und im tiefen Winterschlaf. Siebenschläfer (*Glis glis*). Korrespondierende Abschnitte. Frontalschnitte. Rossman fix. (0 °C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Vergr. 96fach. 3. V 3. Ventrikel (in 2a Umriß nachgezeichnet). T.c. Tuber cinereum. Inf. Infundibulum. R.i. Recessus infundibularis. P.inf. Pars infundibularis (tuberalis) der Adenohypophyse. K.fl. Adeno-neurohypophysäre Kontaktfläche mit Gefäßen (Gf.), die zum portalen Gefäßsystem der Hypophyse gehören. a) Sommerzustand. Tuber cinereum glykogenfrei, bis auf die mit x gezeichneten Stellen. ↓ Glykogenreiche ependymale Tanyocyten in der Wand des Infundibulum. b) Tiefer Winterschlaf. Tuber cinereum sehr glykogenreich, insbesondere in seinem ventro-medialen Bereich (x). ↑ Glykogenreiche ependymale Tanyocyten mit elektiver Fortsatzzeichnung. Im Infundibulum starke Glykogenakkumulation in der ependymalen und subependymalen Lage

bei dem bereits wachen Tier Nr. 6 im Plexus des Seitenventrikels (trotz der Erhöhung der Körpertemperatur) noch das typische glykogenreiche Winterschlafbild.

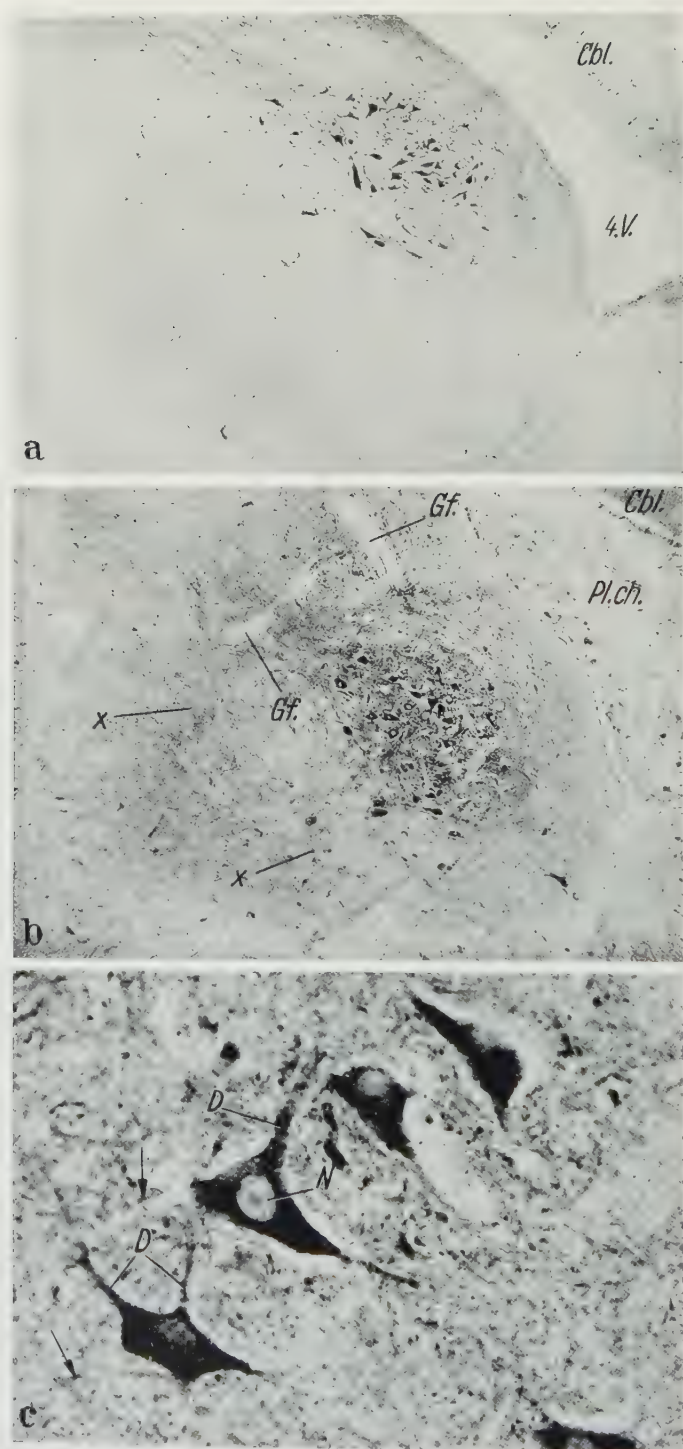


Abb. 3a—c. Glykogengehalt der Medulla oblongata im Sommer und in tiefem Winterschlaf. a und b Igel (*Erinaceus europaeus*). Korrespondierende ventrikelnähe Abschnitte der Medulla mit dem

Bei Nr. 7 dagegen im Seitenventrikel-Plexus nur noch ganz vereinzelte Glykogenkörnchen, im Gegensatz zu dem relativ glykogenreichen Plexus chor. ventr. IV.

Ependym (unter Berücksichtigung des Zwischenhirns). Das dominierende epithelähnliche Ependym im allgemeinen praktisch glykogenfrei, wenn man von vereinzelt ganz feinen, staubförmigen Körnchen absieht, die manchmal in der Umgebung des Plexus chor. angetroffen werden können und im Winterschlaf häufiger sind. Dagegen in dem Tanycyten-Ependym der ventralen Infundibularwand, an der Stelle der adeno-neurohypophysären Kontaktfläche (SPATZ 1958) sogar im Sommer relativ viel Glykogen (Abb. 2a). Im tiefen Winterschlaf wird hier Glykogen in erstaunlich großen Mengen angereichert (Abb. 2b), wobei der Fortsatz der Tanycyten einschließlich des Endfußes prall mit Glykogenkörnchen ausgefüllt ist.

Leber. Die Leber enthielt im tiefen Winterschlaf viel Glykogen (18. 1., 14. 3.). Bei dem am 15. 3. getöteten wachen Tier war sie noch glykogenreicher als am 18. 1., beim Sommertier (24. 6.) dagegen wesentlich glykogenärmer. Das Leberglykogen, das bei den beiden am 21. 2. getöteten Tieren trotz der unterschiedlichen Körpertemperaturen das typische Winterschlafbild bot, hatte bei dem erwärmten und gefütterten dritten Tier dieser Gruppe (Nr. 7) einen starken Rückgang erfahren; die Leber dieses dritten Tieres war von allen 9 untersuchten Siebenschläfern die glykogenärmste. Während des Winterschlafes liegt beim Siebenschläfer eine Hypoglykämie vor (DISCHE, FLEISCHMANN und TREVANI 1931).

Am *Musc. gastrocnemius* zeigte der Vergleich zwei schlafender Siebenschläfer (18. 1.) mit einem wachen Tier (15. 3.) histochemisch (mit der Bleitetraacetat-Schiff-Methode) keinen Unterschied in der Glykogenmenge.

2. Igel (*Erinaceus europaeus* L.)

Untersuchungsgut.

Tabelle 2

Tier Nr.	Zustand	Datum	Geschlecht	Gewicht g	t° C Bauchhöhle
1	Tiefer Winterschlaf	18. 1. 57	♂	380	5
2	Sommertier, wach	24. 6. 58	♂	729	33,5

Untersuchte Regionen. Lückenlose Schnittserien von der Brücke bis zum Halsmark, einschließlich des ganzen Kleinhirns; Temporo-Parietallappen des Großhirns, Plexus chorioidei, Leber.

Befunde. Das Gehirn des untersuchten *winterschlafenden* Igels wies im histochemischen Präparat noch mehr Glykogen auf als das Gehirn winterschlafender Siebenschläfer. Als Untersuchungsobjekt waren die glykogenreichen Kerngebiete

Nucl. XII. c Siebenschläfer (*Glis glis*). Frontalschnitte. Rossman fix. (0°C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. 4. V. 4. Ventrikel, *Cbl.* Cerebellum, *Pl.ch.* Plexus chor. ventr. IV. a) Igel. Sommerzustand. *Formatio reticularis grisea* fast vollständig glykogenfrei. Im Kerngebiet glykogenreiche große Ganglienzellen (schwarz); der lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbare Bereich jedoch weitgehend glykogenfrei. Vergr. 53fach. b) Igel. Tiefer Winterschlaf. *Formatio reticularis grisea* glykogenhaltig (grauer Farbton der Faserstränge x), mit eingestreuten glykogenhaltigen Ganglienzellen. Das Kerngebiet erscheint als ein dunkles Areal, in dem die mit Glykogen prall gefüllten Ganglienzellen eingebettet sind. *Gf.* Gefäße ohne Anhäufung von Glykogen an der Membr. limit. gliae perivasc. Vergr. 53fach. c) Siebenschläfer. Tiefer Winterschlaf. Glykogenreiche große Ganglienzellen. N Zellkern. D glykogenhaltige Dendriten. ↑ Glykogenhaltiger Ausläufer einer Gliazelle. Vergr. 448fach

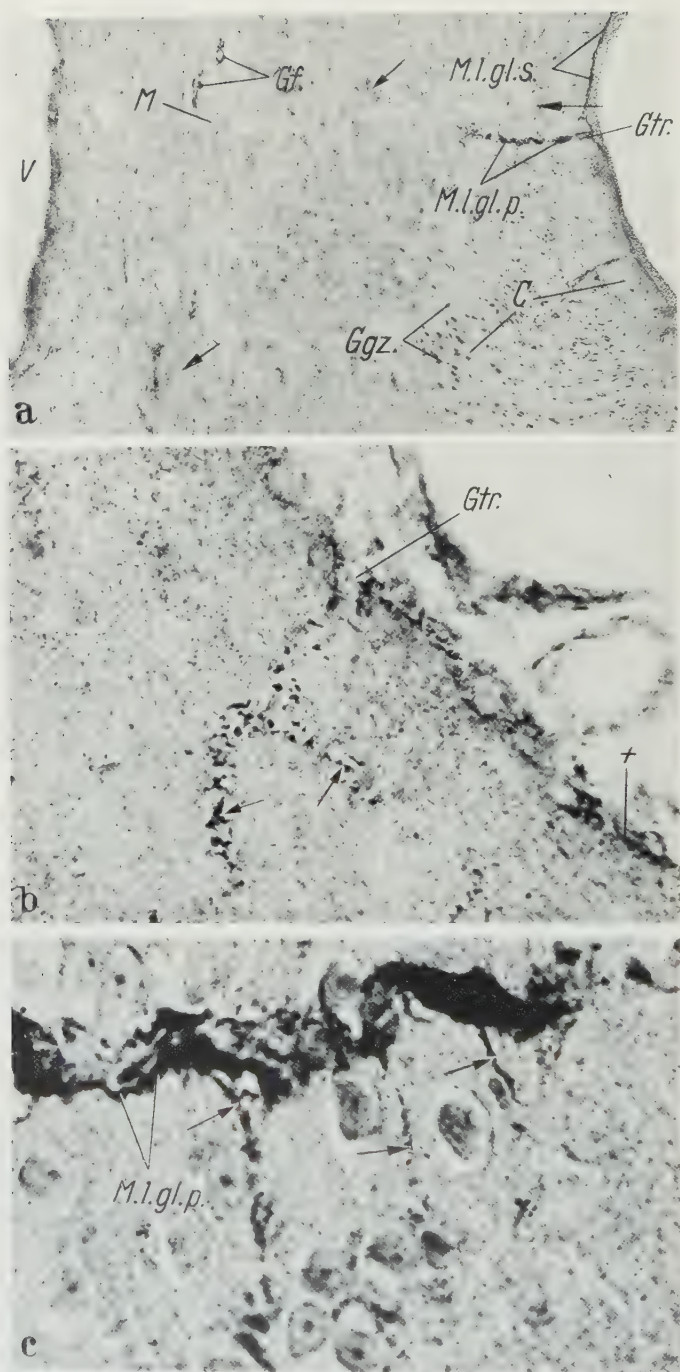


Abb. 4a—c. Glykogenverteilung im Großhirn des Igels und Siebenschläfers im tiefen Winterschlaf. Rossman fix. (0 °C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Igel. Übersicht. *V* Ventrikellichtung. *M.l.gl.s.* Membr. limit. gliae superfic. *Gtr.* Gefäßtrichter mit Glykogenanhäufung an der Membr. limit. gliae perivase. (*M.l.gl.p.*). *C* Großhirnrinde. *Ggz.* Glykogenreiche Ganglienzellen. *M* Mark. *Gf.* Gefäße mit Glykogen an der Membr. limit. gliae perivase. \uparrow Stellen mit herdförmiger Glykogenanreicherung. Vergr. 20fach. b) Siebenschläfer. Molekularschicht der Großhirnrinde mit eindringendem

der Medulla oblongata ganz besonders eindrucksvoll (Abb. 3b), denn sie enthielten sehr viel Glykogen in den lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich der feinsten Zellausläufer. Glykogenhaltige Gliazellen lagen zahlreicher vor und ließen sich mit der Gesamtheit ihrer Fortsätze besser erfassen als beim Siebenschläfer (Abb. 3c). Hervorzuheben sind die überall ganz besonders dicht mit Glykogen beladenen Gliaendfüße der Membr. limit. gliae superfic. (Abb. 4a). Die Umgebung der Membr. limit. gliae perivasc. enthielt dagegen nur in der Großhirnrinde Glykogen, sowohl in der weißen, als auch in der grauen Substanz (Abb. 4a, c). Neben glykogenreichen Astrocyten, deren Gestalt durch die Füllung des gesamten Perikaryons und der Fortsatzabgänge gut zu erkennen war (Abb. 4c), wurden in Gefäßnähe auch noch glykogenreiche Gliazellen mit dem charakteristischen zarten, verzweigten Astwerk der Hortega-Glia beobachtet. In den Plexus chorioidei fand sich ebenfalls Glykogen. Bei dem *Sommertier* konnte Glykogen in mäßigen Mengen nur noch in der äußersten Schicht der Großhirnrinde, in vereinzelt Astrocyten, in einigen begrenzten Abschnitten der Membranae limitantes gliae und z. T. auch in den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata nachgewiesen werden (Abb. 3a). Im Vergleich zum Winterschlafzustand (Abb. 3b) lag ein äußerst eindrucksvoller Glykogenschwund gerade in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich vor (Abb. 3a, b). In den Plexus chorioidei des Sommertieres konnte überhaupt kein Glykogen dargestellt werden.

Die *Leber* war im Sommer glykogenreicher (!) als im tiefen Winterschlaf. Im Winterschlaf liegt beim Igel eine Hypoglykämie vor; nach dem Erwachen steigt der Blutzuckerspiegel deutlich an (SUOMALAINEN 1944).

Beurteilung des Winterschlafzustandes. Die Menge des im ZNS des Siebenschläfers und Igels histochemisch nachweisbaren Glykogens zeigt einen deutlichen Zusammenhang mit dem physiologischen Aktivitätszustand. Das ZNS wacher Sommertiere ist im histologischen Präparat weitgehend glykogenfrei, das ZNS winterschlafender Tiere dagegen sehr glykogenreich. Dieses trifft sowohl für das Großhirn als auch für den Hirnstamm zu. An der Grenze zwischen dem Schlaf- und Wachzustand und kurz nach dem Erwachen findet sich noch das Glykogenbild des Schlafzustandes, wenn auch das Tier schon eine beachtliche motorische Aktivität aufgewiesen hat. Nach einem 10tägigen Wachsein mit Nahrungsaufnahme und erheblicher Motorik war das Glykogen zwar aus den motorischen Vorderhornzellen des Rückenmarkes geschwunden, in den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata aber noch z. T. nachweisbar (Siebenschläfer, vgl. Abb. 1a bis c). Im Bereich der feinsten Zellausläufer kam es aber auch in der Medulla nicht mehr vor. Der allerfeinste Strukturbereich der Großhirnrinde gab dagegen noch eine positive Glykogenreaktion. Hervorzuheben ist der Bereich der Membranae limitantes gliae als bevorzugter Ort der Glykogenablagerung, wobei eine Beziehung dieser glösen Strukturen zu glykogenreichen Ganglienzellen offensichtlich ist. In Hinsicht auf die Grenzmembran wurde ein grundlegender Unterschied zwischen der Großhirnrinde und der Medulla beobachtet. Die Umgebung der Membr. limit.

Gefäß. *Gtr.* Gefäßtrichter. Glykogenanhäufung an der Membr. limit. gliae superfic. (+) und perivasc. (↑). Beachte die zunehmende Akkumulation von Glykogenkörnern in Richtung auf die glösen Grenzmembranen. Nur ein Teil der Körnerchen läßt sich lichtmikroskopisch erkennbaren Strukturen zuordnen. Vergr. 448fach. c) Igel. Von der Pia mater in die Großhirnrinde eindringendes Gefäß mit glykogenbeladenen Fortsätzen (↓) der Gliazellen, die an der tangential getroffenen Gefäßwand auslaufen. Objekt wie in Abb. 4a. Vergr. 704fach

perivasc., die im Großhirn an verschiedenen starken Gefäßen besonders deutlich durch ihren Glykogensaum hervortrat, war in der Medulla auch im tiefsten Winterschlaf nicht elektiv gezeichnet. Hier sei auf die regionalen Unterschiede in der Struktur der perivaskulären glösen Grenzmembran hingewiesen, die BAIRATI (1958) stark hervorhebt. Auch die Strukturen an der Membr. limit. gliae superfic. enthielten im Großhirn und Kleinhirn mehr Glykogen als im verlängerten Rückenmark.

Das verschiedene Verhalten der Großhirnrinde und der Medulla oblongata (als Teil des Hirnstamms) weist offenbar auf grundlegende funktionelle Unterschiede hin, auf die man bisher nicht geachtet hat und die weiter verfolgt werden müssen.

II. Der Glykogennachweis im Gehirn äthernarkotisierter und megaphenschlafender Ratten

Der echte Winterschlaf ist ein eigentümlicher, durch endogene Faktoren gesteuerter Vorgang, der grundlegend von der passiven Kältelethargie zu unterscheiden ist (HENSEL 1955). Es erschien wesentlich, die durch den histochemischen Glykogennachweis im ZNS der Winterschläfer erzielten Ergebnisse mit dem Zustand bei einer andersartigen andauernden Ruhe zu vergleichen. Aus diesem Grunde wurden Ratten für mehrere Stunden oder Tage in einen Narkoseschlaf versetzt, wobei Äther und Megaphen [N-(3'-Dimethylamino-propyl)-3-chlorphenothiazin] zur Anwendung gelangten.

NIESSING (1950) beobachtete mit Silbermethoden im Gehirn äthernarkotisierter Mäuse, wie die Fortsatzverzweigungen der Astrocyten stark zunehmen und die Zahl der stempelartigen Kapillarendfüße stark vermehrt wird. Dieses morphologische Bild ist anders als im Winterschlaf (NIESSING 1957). Über die Wirkungen von Megaphen ist in den letzten Jahren im Zusammenhang mit seiner Anwendung in der Heilkunde viel diskutiert worden. Das Megaphen soll neben seinem hemmenden Einfluß auf das vegetative Nervensystem (vorwiegend den Sympathikus) auch eine zentrale Dämpfung bewirken, insbesondere in der *Formatio reticularis* des Mittelhirns und im Cortex. Der Megaphen-Schlaf ist physiologisch kein künstlicher Winterschlaf; es liegt nur eine Hypothermie ohne die für den Winterschlaf charakteristischen thermoregulatorischen Besonderheiten vor. Auch morphologisch sind die durch den Winterschlaf und den Megaphen-Dauerschlaf hervorgerufenen Organveränderungen nicht die gleichen, wie es z. B. E. S. G. SCHMIDT (1959) durch Untersuchung der Cytodynamik der Speicheldrüsen nachweisen konnte.

Der Megaphenschlaf wurde erzielt durch intramuskuläre oder intraperitoneale Injektion von 0,5—1 cm³ Megaphen BAYER 0,5% (0,025 g in 5 cm³). Auf ein kurzes Exzitationsstadium trat nach 10—15 min ein tiefer Narkosezustand ein, in dem die Tiere nur schwach auf äußere Reize reagierten. Um den Schlafzustand aufrechtzuerhalten, mußte alle 3—4 Std eine Injektion von weiteren 0,5—1 cm³ Megaphen vorgenommen werden.

Versuchsablauf und Untersuchungsgut. Die wesentlichsten Angaben über den Verlauf des Versuches sind der folgenden Zusammenstellung zu entnehmen.

Zum Vergleich mit dem Megaphen-Material wurde das Gehirn einer ♂ 160 g-Ratte nach 5stündiger Äther-Narkose und eines ♀ 148 g-Kontrolltieres untersucht. Bauchhöhlentemperatur: 1. Versuchstier 28° C, 2. Kontrolltier 35,5° C.

Histochemisch untersucht wurden korrespondierende Gehirnteile (Pons, Medulla oblongata, Cerebellum, Temporo-Parietallappen des Großhirns) von 6 megaphennarkotisierten Ratten und 4 Kontrolltieren. Das Gewebsmaterial wurde nach ROSSMAN (0° C) konserviert, das Glykogen mit der Bleitetraacetat-Schiff-Methode (Diastase-Kontrolle) nachgewiesen.

Befunde. Der im Vergleich zum Winterschlafzustand wesentlichste Unterschied sei gleich zu Beginn hervorgehoben. In der Nar-kose kam es zwar nach längerem Schlaf zu einer beträchtlichen Glykogenanhäufung in den großzelligen Kerngebieten der Brücke und der Medulla oblongata, so- wie auch stellenweise zur Füllung der Astrocyten-

Tabelle 3

Tier Nr.	Datum	Ge- schlecht	Ge- wicht g	Dauer des Schlafes Std	Injizierte Gesamt- menge Megaphen in cm ³ (0,005 g/cm ³)	t °C Bauch- höhle
1	15. 3.	♂	158	Kontrolle	—	36,5
2	15. 3.	♂	155	13 ¹ / ₂	2	25
3	17. 4.	♂	179	Kontrolle	—	36
4	17. 4.	♂	200	25 ¹ / ₂	1,5	25
5	18. 4.	♂	222	66 ¹ / ₂	8	20
6	19. 4.	♂	207	Kontrolle	—	35,5
7	19. 4.	♂	214	86 ¹ / ₂	8,5	21
8	23. 6.	♂	—	Kontrolle	—	34
9	23. 6.	♂	137	15	4	22
10	23. 6.	♂	157	48	4	24

endfüße an der Membr. limit. gliae superfic., jedoch niemals zur Glykogenanreicherung in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich und an der *Membr. limit. gliae perivasc.* Dadurch war der Hirnschnitt, im Gegensatz zum Winterschläferhirn, nur in begrenzten Arealen angefärbt, blaß. In der Großhirnrinde von dauernarkotisierten Ratten war auch nach den längsten Schlafzeiten kein Glykogen nachweisbar, wogegen die Großhirnrinde winterschlafender Tiere sehr viel Glykogen enthielt. Die ausführliche Beschreibung der Befunde kann deshalb auf die Brücke, die Medulla oblongata und das Cerebellum beschränkt werden.

1. Äthernarkose

5 Std. Im Vergleich zum Kontrolltier kein wesentlicher Unterschied in der Farbreaktion des ganzen Hirnschnittes. Geringe Glykogenmengen in den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata. Bei dem Kontrolltier sind diese Kerngebiete völlig glykogenfrei. Astrocytenendfüße sowohl in der Medulla oblongata als auch im Cerebellum glykogenfrei. Plexus chor. ventr. IV glykogenfrei. Kleine Glykogenkörnchen in vereinzelter Ependymzellen des 4. Ventrikels. Ein ähnlicher Befund kann an gleicher Stelle gelegentlich auch bei Kontrolltieren erhoben werden.

Beurteilung. Bildung geringer Glykogenmengen in den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata.

2. Megaphenschlaf

13¹/₂ Std. Schwache, fleckenartige, auf Anwesenheit von Glykogen beruhende Rotfärbung des Schnittes. Erhebliche Glykogenmengen in den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata. Purkinje-Zellen des Kleinhirns glykogenfrei. Im Cerebellum vereinzelter glykogenhaltige Astrocytenendfüße an der Membr. limit. gliae superfic. Viel Glykogen in den Epithelzellen des Plexus chor. ventr. IV. Ependym des 4. Ventrikels glykogenfrei.

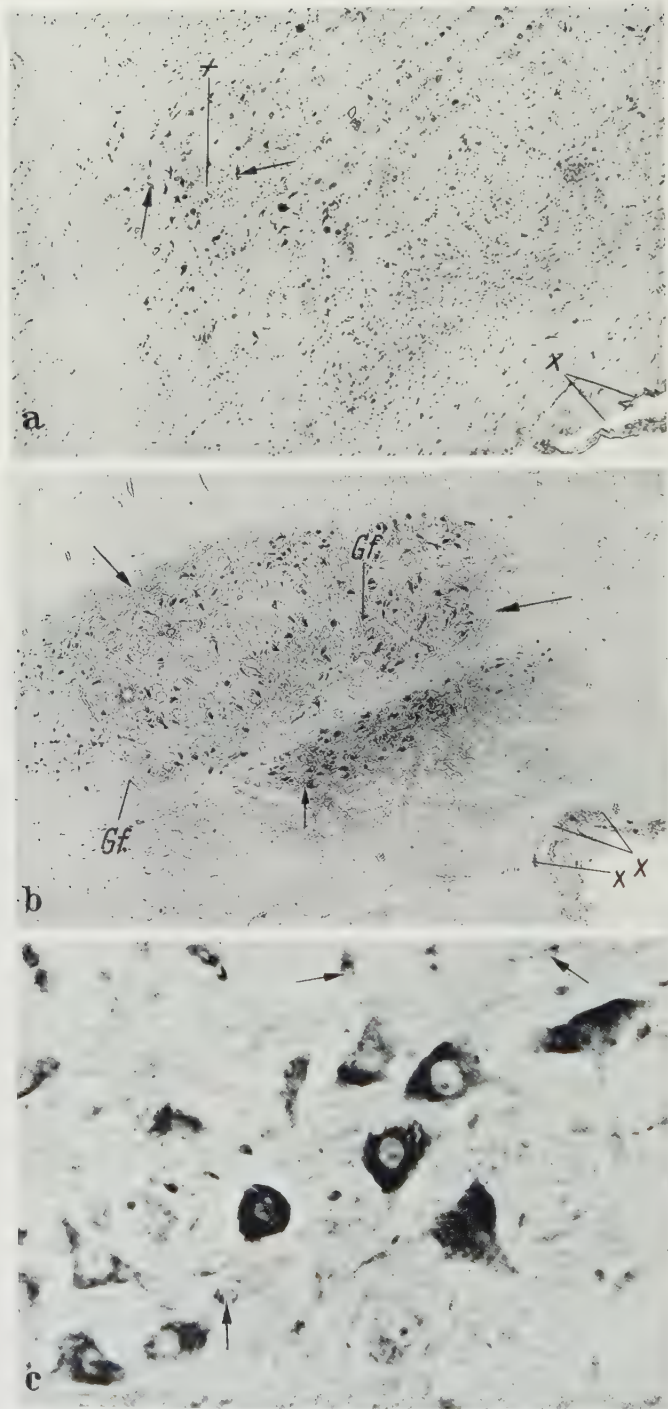


Abb. 5a—c. Glykogendarstellung in der Medulla oblongata der Ratte nach längerem Megaphenschlaf. Korrespondierende Abschnitte (Nucleus N. XII). Sagittalschnitte, Rossman fix. (0 °C). Bleitetracetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Normales Kontrolltier. Kein histochemisch nach-

Beurteilung. Im Vergleich zum Kontrolltier deutliche Glykogenzunahme in manchen Kerngebieten der Medulla oblongata, sowie im Plexus chor. ventr. IV.

15 Std. Farbton der Schnitte in einigen Abschnitten der Medulla oblongata, insbesondere aber im Cerebellum intensiver als nach 13 $\frac{1}{2}$ Std Megaphenschlaf. Leichte weitere Glykogenzunahme in den Ganglienzellen der Medulla oblongata (Abb. 5c). Plexus chor. ventr. IV glykogenhaltig wie nach 13 $\frac{1}{2}$ stündigem Schlaf. Glykogenkörnchen auch in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns. Stellenweise durch Glykogen elektiv gezeichnete Astrocytenendfüße an der Membr. limit. gliae superfic.

Beurteilung. Im Vergleich zum 13 $\frac{1}{2}$ stündigen Megaphenschlaf leichte Glykogenzunahme, insbesondere im Kleinhirn.

25 $\frac{1}{2}$ Std. Farbton schwächer als nach 15stündigem Schlaf; entspricht etwa dem Befund nach 13 $\frac{1}{2}$ Std. Im Vergleich zum 13 $\frac{1}{2}$ - und 15stündigem Schlaf enthalten die großen Ganglienzellen der Medulla oblongata weniger Glykogen. Vereinzelte glykogenhaltige Astrocytenendfüße an der Membr. limit. gliae superfic. Ependym am Boden des 4. Ventrikels glykogenfrei. Purkinje-Zellen des Kleinhirns glykogenfrei. Im Kleinhirn periphere Aufzweigungen der Astrocytenfortsätze, sowie Endfüße deutlich durch Glykogenkörnchen gezeichnet. Plexus chor. ventr. IV glykogenärmer als nach 13 $\frac{1}{2}$ - und 15stündigem Schlaf.

Beurteilung. An Stelle der erwarteten weiteren Glykogenzunahme etwas geringere Mengen.

48 Std. An einigen Stellen der Schnitte ein intensiverer Farbton als nach 15stündigem Schlaf, insbesondere im Cerebellum. Die großen Ganglienzellen der Medulla oblongata enthalten zahlreiche Glykogenkörnchen und -schollen (Abb. 5b). Vereinzelte glykogenhaltige Astrocytenendfüße an der Membr. limit. gliae superfic. Im Ependym des 4. Ventrikels vereinzelt kleine Glykogenkörnchen. Glykogengehalt der Purkinje-Zellen im Vergleich zum 25 Std-Tier vermehrt. Besonders zahlreiche Glykogenkörnchen in den Ausläufern und Endfüßen der Astrocyten. Im Plexus chor. ventr. IV etwas weniger Glykogen als nach 25stündigem Schlaf.

Beurteilung. Im Vergleich zu den 13 $\frac{1}{2}$ - und 15 Std-Tieren enthält der Plexus chor. ventr. IV weniger Glykogen. In der Medulla ist der Glykogenvorrat der großen Ganglienzellen etwa gleich geblieben. Glykogenzunahme im Kleinhirn, insbesondere in der Glia.

66 $\frac{1}{2}$ Std. Die großzelligen Kernareale in der Medulla oblongata intensiver gefärbt als nach 48stündigem Schlaf, die Kleinhirnrinde dagegen etwas schwächer getönt. Deutliche Glykogenzunahme in den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata. Zunahme der glykogenhaltigen Astrocytenendfüße an der Membr. limit. gliae superfic. Deutliche Zugehörigkeit dieser Astrocyten zu den glykogenreichen Kerngebieten. Im Kleinhirn dagegen weitgehend glykogenfreie Astrocytenendfüße, wenn auch die Purkinje-Zellen stellenweise recht viel Glykogen

weisbares Glykogen. Das Kerngebiet (+) tritt kaum in Erscheinung (Zellkerne dunkle Punkte). Die Ganglienzellen (†) sind vollständig glykogenfrei; ihr Cytoplasma hat sich lediglich mit Hämaun gefärbt. *x* Basale Oberfläche. Vergr. 53fach. *b*) Nach 48stündigem Megaphenschlaf. Elektive Glykogen-darstellung im ganzen Kerngebiet, das in der völlig farblosen Umgebung deutlich hervortritt. Glykogen-reiche Ganglienzellen (schwarz). Die positive Reaktion des interzellulären Bereichs im Vergleich zum Winterschlafzustand schwach (†). *Gf.* Gefäße ohne Glykogenanhäufung an der Membr. limit. gliae perivasc. An der Membr. limit. gliae superfic. nur stellenweise (*x*) Glykogen (räumliche Beziehung zu den glykogenreichen Kerngebieten). Vergr. 53fach. *c*) Nach 15stündigem Megaphenschlaf. Glyko-genreiche große Ganglienzellen (dunkel). Bei † Glykogenkörnchen im Perikaryon von Gliazellen. Bereich der feinsten Zellausläufer im Gegensatz zum Winterschlafzustand (vgl. Abb. 1, 3) farblos (glykogenfrei). Vergr. 448fach

enthalten. Plexus chor. ventr. IV glykogenärmer als nach 48 Std. Ependym des 4. Ventrikels glykogenfrei.

Beurteilung. Zunahme der Glykogenmenge in den großen Ganglienzellen der Medulla, wobei offensichtlich das Maximum erreicht wird. Weitere Abnahme des Glykogens im Plexus chor. ventr. IV.

86 $\frac{1}{2}$ Std. Der gleiche Farbton der Schnitte wie nach 66 $\frac{1}{2}$ stündigem Schlaf. In den großen Ganglienzellen der Medulla oblongata und in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns ein Befund, der den Verhältnissen nach 66 $\frac{1}{2}$ Std weitgehend entspricht. Stellenweise Glykogenanreicherung in den Astrocytenfortsätzen und -endfüßen an der Membr. limit. gliae superfic. (Medulla oblongata, Kleinhirn). Plexus chor. ventr. IV etwas glykogenreicher als beim 66 $\frac{1}{2}$ Std-Tier. Recht zahlreiche Glykogenkörnchen im Ependym des 4. Ventrikels.

Beurteilung. Im Vergleich zum 66 $\frac{1}{2}$ Std-Tier keine wesentlichen Veränderungen, mit Ausnahme der starken Glykogenzunahme in den Fortsätzen und Endfüßen der Astrocyten (sowohl in der Medulla oblongata als auch im Cerebellum).

Leber: In der Leber während der Narkose starker Glykogenschwund.

III. Vergleich der Befunde im physiologischen Winterschlaf und pharmakologischen Dauerschlaf

Nach dem histotopochemischen Glykogenbefund ist die Stoffwechsellage des ZNS im Megaphen-Schlaf anders als im physiologischen Winterschlaf. Im Hirnstamm liegt der wesentliche Unterschied darin, daß im Megaphen-Schlaf, trotz Glykogenbildung im Perikaryon der großen Ganglienzellen, der lichtmikroskopisch homogen erscheinende Bereich (Abb. 5b) der feinsten Verzweigungen glykogenarm bleibt. Dieser Unterschied scheint von wesentlicher funktioneller Bedeutung zu sein und muß weiter analysiert werden. In den glösen Elementen trat das Glykogen im Megaphen-Schlaf weniger hervor, ganz im Gegensatz zum Winterschlaf.

In den großen Ganglienzellen des Hirnstammes war eine recht deutliche Abhängigkeit der Glykogenbildung von der Schlafdauer und wohl auch von der Menge des verabfolgten Megaphens sichtbar. Allerdings nahm die Glykogenmenge nach einem 13stündigem Schlaf kaum oder noch wenig zu. Im Gegensatz zu den Ganglienzellen nahm die Glykogenmenge im Plexus chor. ventr. IV nach 13 bis 15stündigem Megaphenschlaf wieder ab. Im Winterschlaf wurde dagegen der glykogenreichste Plexus nach den längsten und tiefsten Schlafperioden beobachtet.

Der eindrucksvollste Unterschied zwischen dem Winterschlaf- und dem Megaphenschlaf-Zustand lag an der Großhirnrinde vor, wo im Megaphenversuch das histochemisch nachweisbare Glykogen ganz vermißt wurde.

Eine Deutung dieser Unterschiede soll erst zum Schluß in der Diskussion versucht werden, wenn alle Befunde vorliegen. Zuvor soll aber noch ein experimenteller Vorstoß in der Frage nach einem gerichteten Stofftransport unternommen werden.

IV. Histochemischer Glykogennachweis nach operativen Eingriffen

Aus früheren histotopochemischen Befunden (OKSCHE 1958) und den Ergebnissen dieser Studie konnte geschlossen werden, daß es unwahrscheinlich ist, daß

ein aus der Blutbahn stammender glukosehaltiger Saftstrom das morphologische Substrat des ZNS gleichmäßig, wie etwa einen Schwamm passiert. Wenn es unter bestimmten funktionellen Bedingungen zur Bildung von Glykogen kommt, so ist dieses sehr unterschiedlich über das ganze ZNS verteilt. Es ergaben sich Anhaltspunkte für gliöse Leitbahnen, die bestimmten Kernarealen zugeordnet sind, wobei die nervösen und Gliaelemente in einer gegenseitigen funktionellen Abhängigkeit stehen. Da ein Teil dieser Befunde an gefriergetrocknetem Material erhoben wurde (OKSCHE 1958), sind Konservierungsartefakte durch Stoffflucht und Verlagerung ausgeschlossen. Das topochemische Bild spricht dafür, daß gliöse Stoffstraßen existieren, die in das submikroskopische lückenlose Nebeneinander (Abb. 6, 7) der neuronalen und gliösen Strukturen ausmünden. Die Beobachtungen weisen darauf hin, daß bei niederen Wirbeltieren auch ein glukosehaltiger Saftstrom aus dem Liquor denkbar ist. In der Gewebekultur pulsiert das Cytoplasma sowohl in den Glia- als auch in den Ganglienzellen. Wenn in einer Struktur wirklich ein Stofftransport vorliegt, so kann man annehmen, daß nach einer Unterbrechung der Leitbahn eine Akkumulation von Stoffen proximal von der Durchtrennungsstelle auftreten wird (vgl. OKSCHE 1959/60).

Zweierlei soll der operative Eingriff zum Ziel haben:

1. Unterbrechung der Gliafortsätze, die räumlich Ganglienzellen zugeordnet sind. In dieser Hinsicht sind die ependymalen Tanycyten wegen der Länge ihrer Fortsätze besonders geeignet. Ihre Cytodynamik weist darauf hin, daß sie funktionell den Astrocyten der höher differenzierten Form entsprechen (OKSCHE 1958).
2. Zerstörung des Bereichs der nur elektronenoptisch sichtbaren feinsten Aufzweigungen, weil dieser in seiner Gesamtheit eine riesige Kontaktfläche neuronaler und gliöser Elemente darstellt.

Der Eingriff wurde bei Grasfrosch und Ratte vorgenommen.

1. Unterbrechung der ependymalen Zellfortsätze bei *Rana temporaria* L.

Material und Operation. Der Eingriff fand bei 6 Temporarien am 15. 10. 58 statt. Um das Ausgangsstadium im histologischen Glykogenbild kennenzulernen, wurden unmittelbar vor der Operation zwei Gehirne von normalen Kontrolltieren konserviert (LISON, ROSSMAN, 0° C).

In Äther-Narkose wurde die Haut in der Medianlinie des Kopfes von der Verbindungslinie der hinteren Augenränder bis zum Trommelfell gespalten und die Schädeldecke freigelegt. Die Umriss des Telencephalon, Diencephalon und Mesencephalon sind meist durch den relativ dünnen Knochen gut zu erkennen. Unter dem Stereo-Mikroskop (Zeiss) wurde die fein zugeschliffene Spitze einer ausgeglühten Präpariernadel unter Drehung durch die knöcherne Schädeldecke geführt. Der Einstich in das Gehirn trug dem örtlichen Verlauf der Ependymfortsätze Rechnung, so daß er senkrecht auf die Zellausläufer traf und sie unterbrach. Solche Verletzungen habe ich am kaudalen Hemisphärenpol des Telencephalon (dorsale und laterale Seitenventrikelwand), in der lateralen Wand des Diencephalon und am Tectum opticum (dorsale Wand) gesetzt, die besonders starke und glykogenreiche Fortsätze der Ependymzellen aufweisen (OKSCHE 1956/57, 1958). An den meisten Objekten konnten zwei Einstiche an verschiedenen Orten vorgenommen werden (s. Tabelle 4). Gelegentlich habe ich noch die Gehirnoberfläche nachkoaguliert, um durch Verödung der stempelförmigen Endfüße und der feinen Endausläufer der Tanycyten die äußerste Peripherie der Ependymzelle zu treffen. Diese enthält zahlreiche Mitochondrien (Abb. 7), gibt eine positive alkalische Phosphatase-Reaktion und scheint im Stoffaustausch eine besondere Rolle zu spielen. Nach dem Verschuß des Stichkanals im knöchernen Schädel durch ein Stückchen Spongioprot (MACK), wurden die wieder vereinigten Ränder des Hautschnittes mit einem dünnen Collodiumfilm überzogen. Die Dauer des ganzen Eingriffes betrug 7—10 min. Nach weiteren 10 min konnte bei den Fröschen die allmähliche Rückkehr des normalen Muskeltonus beobachtet werden; die Tiere richteten sich wieder auf und reagierten auf Berührung mit anfänglich noch etwas lahmen Fluchtbewegungen.



Abb. 6. Elektronenmikroskopisches Bauprinzip des Froschhirns (*Rana temporaria*). Vergr. 16600fach. Verschieden starke mitochondrienhaltige (M) Zellausläufer der Ganglien- und Gliazellen sind bis auf Zwischenräume von 150—200 Å lückenlos gefügt. Einige dieser Fortsätze befinden sich an der Grenze oder jenseits des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens. In dieser Größenordnung ist eine sichere Identifizierung der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Zelltyp nicht mehr möglich. MK Markhaltige Nervenfasern mit Neurofilamenten (Nf)

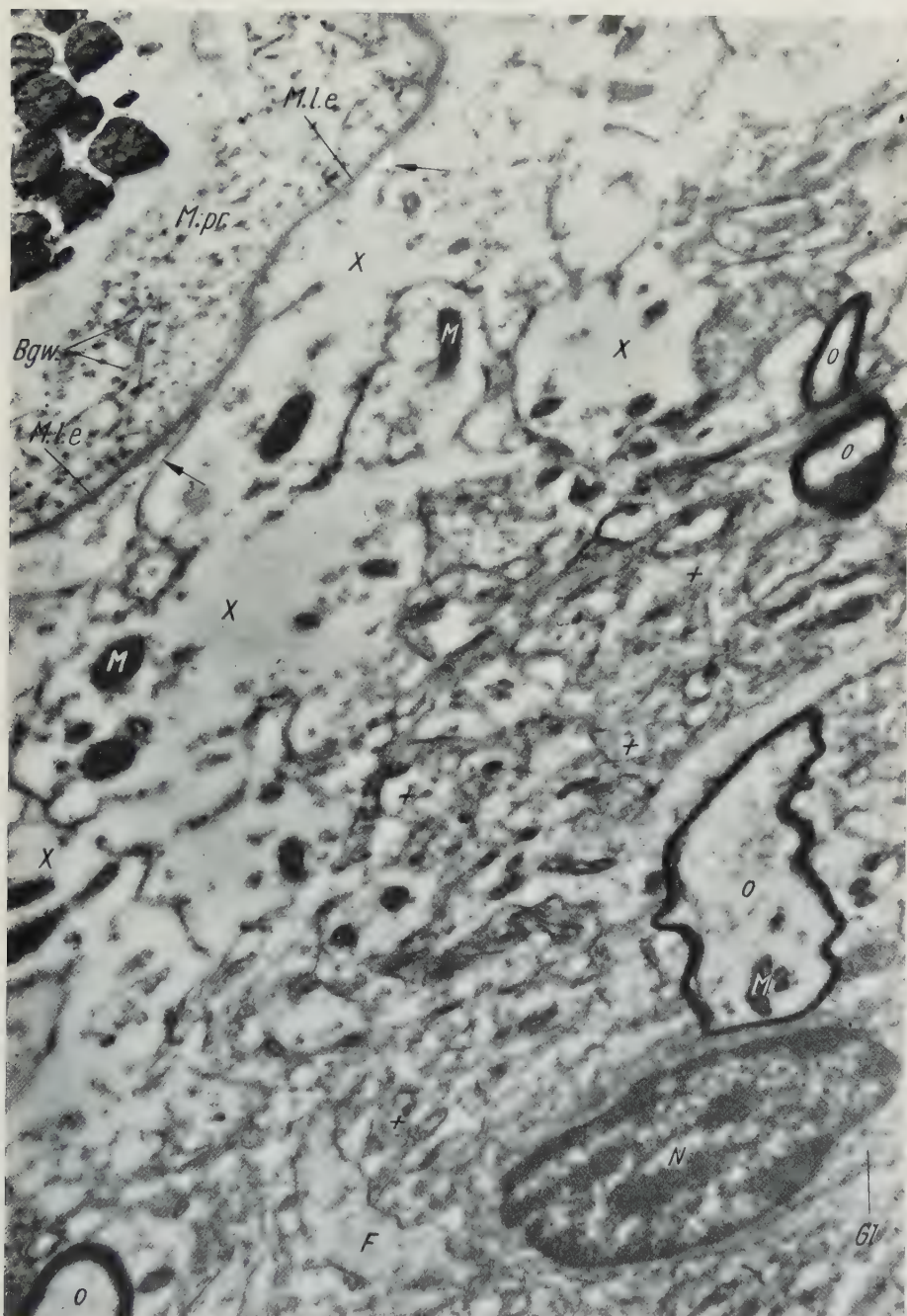


Abb. 7. Elektronenmikroskopische Feinstruktur der Endfüße ependymaler Taneycyten an der äußeren Grenzmembran des ZNS von *Rana temporaria*. Vergr. 16600fach. Bgw. Bindegewebsfibrillen der weichen Hirnhaut (Meninx primitiva *M.pr.*). *M.l.e.* Äußere Grenzmembran, die als Doppellamelle in Erscheinung tritt. Die Endfüße, die mit *x* gekennzeichnet wurden, treten hier als helle, relativ strukturarme Areale in Erscheinung. *F* Ein Ependymfortsatz, der zum Endfuß führt. Bei *+* Zellmembranen, die für eine gelappte Struktur der Endfüße sprechen. Die Endfüße zeichnen sich (im Vergleich zu den Zellstrukturen bei *+*) durch ihre auffallend großen Mitochondrien (*M*) aus. Die Herkunft der im Areal *+* sichtbaren feinen Zellausläufer kann nicht identifiziert werden. *o* Markhaltige Nervenfasern. *Gl* Gliazelle, *N* Zellkern

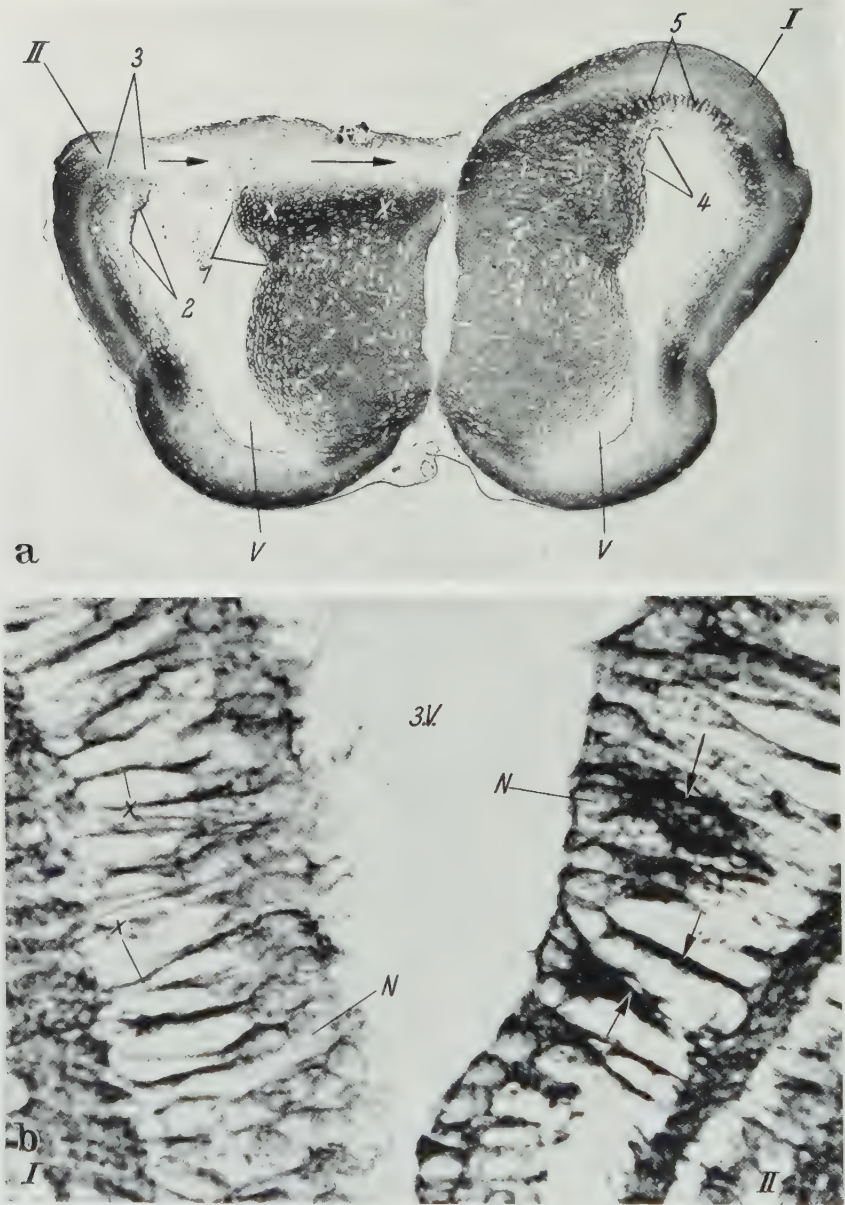


Abb. 8a u. b. Glykogenverteilung im Gehirn des Grasfrosches (*Rana temporaria*) nach Unterbrechung der Tanyocytenfortsätze durch Stichverletzung. Frontalschnitte. Lison fix. (0° C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Telencephalon am 8. Tage nach dem Eingriff. *I* Unverletzte, *II* verletzte Großhirnhemisphäre. *V* Seitenventrikel. → Verlauf des Stichkanals — glykogenfreie (helle) Straße. *x* Wallartige Glykogenanhäufung am Wundrand. Die Ependymzellen (Tanyocyten), deren Fortsätze in dieses Areal einstrahlen, liegen bei *I*; 2 = Glykogenanhäufung im Perikaryon ependymaler Tanyocyten, deren Fortsatzverlauf bei 3 unterbrochen ist (vgl. dazu die spiegelbildlich entsprechende Stelle auf der anderen Seite des Ventrikelsystems (4), die keinen Glykogensaum an der freien Ventrikeloberfläche aufweist). 5 Streifige Zeichnung durch Tanyocytenfortsätze, die kettenartig angeordnete Glykogenkörnchen enthalten. Vergr. 38fach. b) Diencephalon am 3. Tag nach dem Eingriff. Einseitige Unterbrechung der Tanyocytenfortsätze. 3. *V*. 3. Ventrikel. *I* Unverletzte, *II* verletzte Seite; der Stichkanal, der den Fortsatzverlauf im rechten Winkel trifft, liegt rechts außerhalb der Bildebene. Das Ependym ist auf beiden Seiten stark gequollen, der Zellfortsatz erscheint in die Länge gezogen. *N* Zellkern. *x* Zarte, glykogenhaltige Zellfortsätze auf der unverletzten Seite. ↑ Stark aufgetriebene, besonders glykogenreiche (schwarz) Zellfortsätze auf der verletzten Seite. Vergr. 558fach

Um das Verhalten der operativ beeinflussten Ependymzellen in Hinsicht auf das Glykogen zu verfolgen, schien ein zusätzlicher experimenteller Kunstgriff angebracht, der nach eigener Erfahrung (OKSCHÉ 1958) zur Glykogenanhäufung im ZNS führt — die Abkühlung. In früheren Versuchen wurde die erste Anhäufung des Glykogens im Ependym bereits nach zweitägiger Kühlung beobachtet; nach 4 Wochen lag ein ausgeprägter Befund vor. Aus diesem Grunde wurden die operierten Frösche im Kühltank (+ 4° C) gehalten. Alle sechs operierten Tiere hatten den Eingriff gut überstanden. Je ein Frosch wurde 1, 2, 3, 4 und 8 Tage und 4 Wochen nach der Operation getötet. Gleichzeitig mit dem letzten operierten Frosch wurde wieder ein normales Kontrolltier aus dem Ranarium konserviert.

Die Prüfung der histologischen Präparate zeigte, daß der Eingriff im Sinne des Versuches an allen Objekten gelungen war. Die Tiefe und die flächenhafte Ausdehnung der Verletzung hatten an den einzelnen Gehirnen ein recht verschiedenes Ausmaß, so daß die Auswirkungen ventrikelnaher und oberflächennaher Verletzungen studiert werden konnten. Da die Befunde eine deutliche Gesetzmäßigkeit zeigen, ist es nicht notwendig, den Zustand jedes einzelnen Wundbereichs genauer zu beschreiben.

Tabelle 4

Tier Nr.	Ge- schlecht	Gew. g	Datum	Tag nach Op.	t ° C Kloake	Lokalisation der Verletzung					
						Telence- phalon	Epitha- lamus	Pl. ch. v. III	Para- physe	Epi- physe	Mesence- phalon
1	♂	30	16. 10.	1.	13		+ re.				
2	♂	36	17. 10.	2.	10	+ li.	+ li.	+	+	+	
3	♂	42	18. 10.	3.	12	+ re., + li.				+	(+) re.
4	♂	44	19. 10.	4.	10,5	+ re., + li.	+ li. (re.)			(+)	(+) re.
5	♀	16	23. 10.	8.	13	(+) re.					+ li.
6	♂	47	15. 11.	28.	8 ¹	+ re.		+	+	(+)	+ re., + li.

¹ Kloakentemperatur des Kontrolltieres im Freilandranarium: 9,5°. + Vollständige Unterbrechung der Tancytenfortsätze bzw. schwere Strukturschädigung (Plexus, Paraphyse, Epiphyse), (+)=leichtere Schädigung. re.=rechts, li.=links.

Methode. Der histochemische Glykogenachweis wurde mit der Bleitetraacetat-Schiff- und mit der Chromsäure-Perjodsäure-Schiff-Methode durchgeführt.

Befunde. Das Wesentliche kann im Folgenden zusammengefaßt werden:

1. Das am schwersten geschädigte, dem Stichkanal unmittelbar anliegende Gewebe, die stark koagulierten, oberflächlichen Bezirke und die Gewebstrümmer unterschieden sich schon am 1. Tag nach der Operation von der unbeeinträchtigten Umgebung dadurch, daß sie überhaupt kein Glykogen enthielten. Dieser Bereich war auch noch nach 8 Tagen (Abb. 8a) und 4 Wochen völlig glykogenfrei. Diesem Glykogenschwund zum Trotz lag hier noch ein relativ gut erhaltenes morphologisches Strukturgefüge vor, das deutlich färbbare kleine Gliazellkerne und sehr stark erweiterte Gefäße aufwies. Nur noch am 1. Tag nach der Operation konnten in den abgetrennten glykogenfreien Bezirken ganz vereinzelt glykogenreiche Ependymendfüße beobachtet werden, die sich kontrastreich von der ungefärbten Umgebung abhoben.

2. In einer unmittelbar auf den glykogenfreien Randbezirk folgenden Zone (proximal von der Schnittstelle), die in erster Linie aus lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Strukturelementen besteht, wurde zum ersten Mal am 2. Tag nach der Operation eine leichte Intensitätszunahme der Glykogenreaktion beobachtet. Am 3. Tag nach der Operation war der Glykogenreichtum dieser Zone schon sehr deutlich. Am 4. Tag hob sie sich noch stärker von der unverletzten

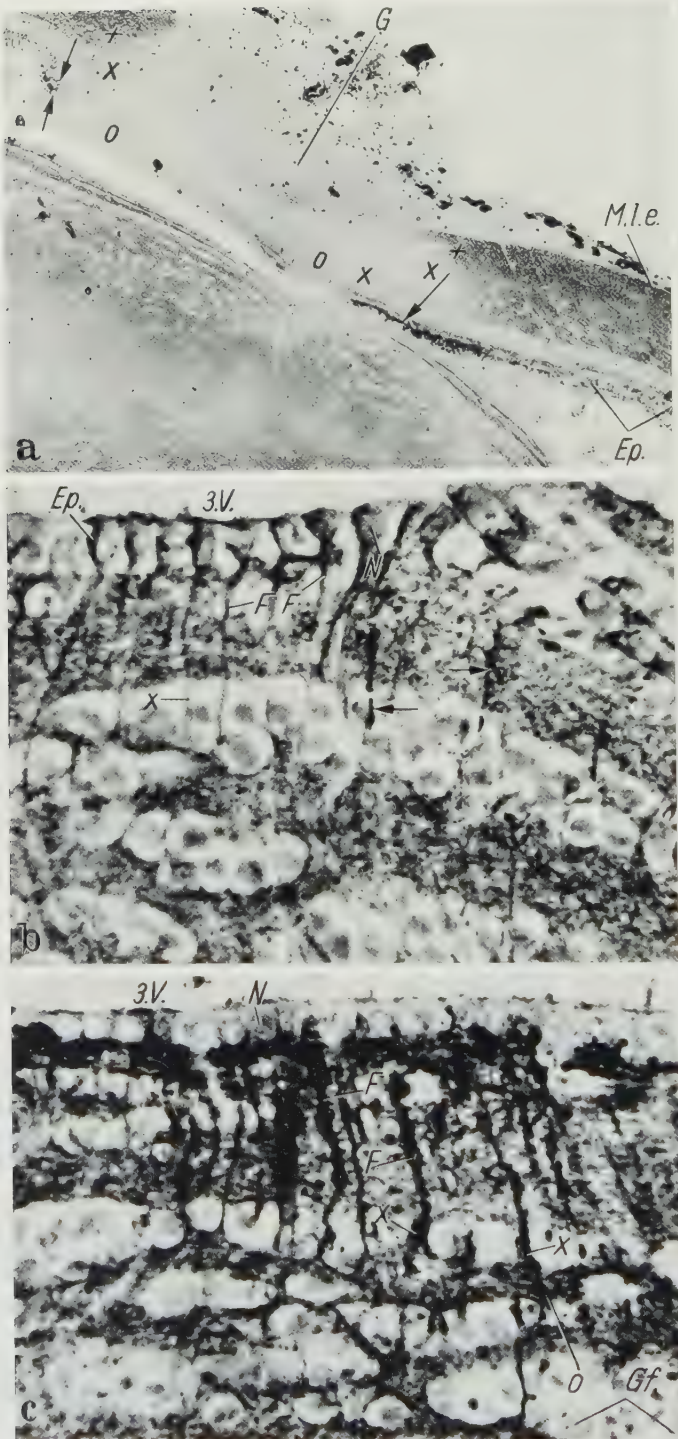


Abb. 9a—c. Glykogenverteilung im Gehirn eines Grasfrosches (*Rana temporaria*) 4 Wochen nach Stichverletzung und Koagulierung der Oberfläche. Frontalschnitte. Lison fix. (0° C). Chromsäure-Periodsäure-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Tectum opticum. M.l.e. Äußere Grenzmembran

Umgebung ab, deren Glykogenreaktion im Vergleich zu den Kontrolltieren ganz normal schien. Dieser glykogenreichere Bezirk ging allmählich in das unbeeinträchtigte, normal reagierende Gewebe über. Am 1.—2. Tag nach der Operation traten die lichtmikroskopisch gut sichtbaren, stärkeren Abschnitte der Ependymfortsätze im Glykogenpräparat nicht besonders hervor.

3. Vom 1.—3. Tag nach der Operation fiel am Ventrikelependym eine sehr starke Höhenzunahme auf, die nicht nur auf den beschädigten Bereich beschränkt blieb, sondern einen ausgesprochen generalisierten Charakter aufwies. Stellenweise war sie so stark, daß einige besonders enge Abschnitte des 3. Ventrikels verlegt wurden. Die Ependymzellen schienen am Abgang ihres Fortsatzes aus dem sie umhüllenden Faserwerk herauszuquellen (Abb. 8b) und wurden so, im Gegensatz zum normalen Zustand, besonders gut, isoliert sichtbar. Sie waren wie besät mit feinsten, staubförmigen Glykogenkörnchen, die oft an den Stellen, wo der periphere Fortsatzverlauf unterbrochen war, eine stärkere Akkumulation zeigten (3. Tag, Abb. 8b). Der Zellkern schien ebenfalls vergrößert, stark abgerundet. Am 4. Tag nach dem Eingriff konnte diese auffallende Quellung des Ependyms nur noch in unmittelbarer Umgebung des Einstichs beobachtet werden. 8 Tage nach der Operation lag überall wieder das normale Zellbild des Ependyms vor.

4. Gleichzeitig mit einem Rückgang der diffusen Glykogenanhäufung am Rande des Stichkanals machte sich am 8. Tag nach dem Eingriff eine stärkere Glykogenzeichnung der Ependymfortsätze bemerkbar, die aber nur auf den operativ angegangenen Bezirk, auf die proximalen Stümpfe beschränkt blieb (Abb. 8a).

5. Vier Wochen nach der Operation war das Gehirn des gekühlten Versuchstieres als Ganzes glykogenärmer als das Gehirn eines zur gleichen Zeit im Freien getöteten Frosches. Die Ependymzellen zeigten die normale Höhe. Eine Randzone mit diffuser Glykogenanreicherung wurde an den verletzten Stellen nicht mehr beobachtet. Das zugrunde gegangene Gewebe war der gesunden Umgebung gegenüber deutlich abgesetzt. Den wesentlichsten Befund stellten ungewöhnlich stark aufgetriebene, mit Glykogen gefüllte Fortsätze der Ependymzellen (Abb. 9a, c) dar, die in der lateralen Wand des Diencephalon, insbesondere aber in der dorsalen Wand des Tectum opticum deutlich bis zur Läsionsstelle verfolgt werden konnten. Die enorme Glykogenanreicherung im proximalen Stumpf dieser ependymalen Tanycyten (Abb. 9c) ist ohne Zweifel eine Folge der operativen Unterbrechung. Dafür sprechen 1. ihre deutliche räumliche Beziehung zum Stichkanal, 2. der Vergleich mit eng benachbarten gleichseitigen oder spiegelbildlich entsprechenden Abschnitten der Ventrikelwand (Abb. 9b, c).

6. Der *Plexus chor. ventr. IV*, der in keinem einzigen Fall Zeichen direkter Verletzung aufwies, war bis zum 3. Tag nach der Operation ungewöhnlich glykogenarm. Dagegen wurde am 4. Tag wieder eine größere Glykogenmenge nachgewiesen.

G Gerinnsel. o Verletzte, vollkommen glykogenfreie (helle) Zone. x Übergang zum unverletzten Gebiet mit stark aufgetriebenen, ungewöhnlich glykogenreichen Fortsätzen der Ependymzellen (†). + Diffuse Glykogenanhäufung in der Verletzungsrandzone. Ep. Ependymale Tanycyten mit normalem histologischen Glykogenbild im Perikaryon und im proximalen Teil des Zellausläufers. Vergr. 53fach. b und c Diencephalon. Einander spiegelbildlich entsprechende seitliche Wände des 3. Ventrikels (um 90° gedreht). b) Unverletzte Seite. 3. V. 3. Ventrikel. Ep. Ependymale Tanycyten. N Zellkern. F Zarte Zellfortsätze, die Glykogen enthalten und bei x durch einen Ganglienzellverband ziehen. † Bei kettenartig angeordnete Glykogenkörnchen. Vergr. 448fach. c) Verletzte Seite. 3. V. 3. Ventrikel. N Zellkern. F stark, z. T. bizarr aufgetriebene Fortsätze der Ependymzellen, die ungewöhnlich viel Glykogen (schwarz) enthalten. Bei x Durchtritt im Bereich eines Ganglienzellverbandes. o Plumpes Ende des proximalen Stumpfes kurz vor der Durchtrennungsstelle. Gf. Stark erweitertes Gefäß, das am Rande des senkrecht zu den Fortsätzen verlaufenden Wundkanals liegt. Vergr. 448fach

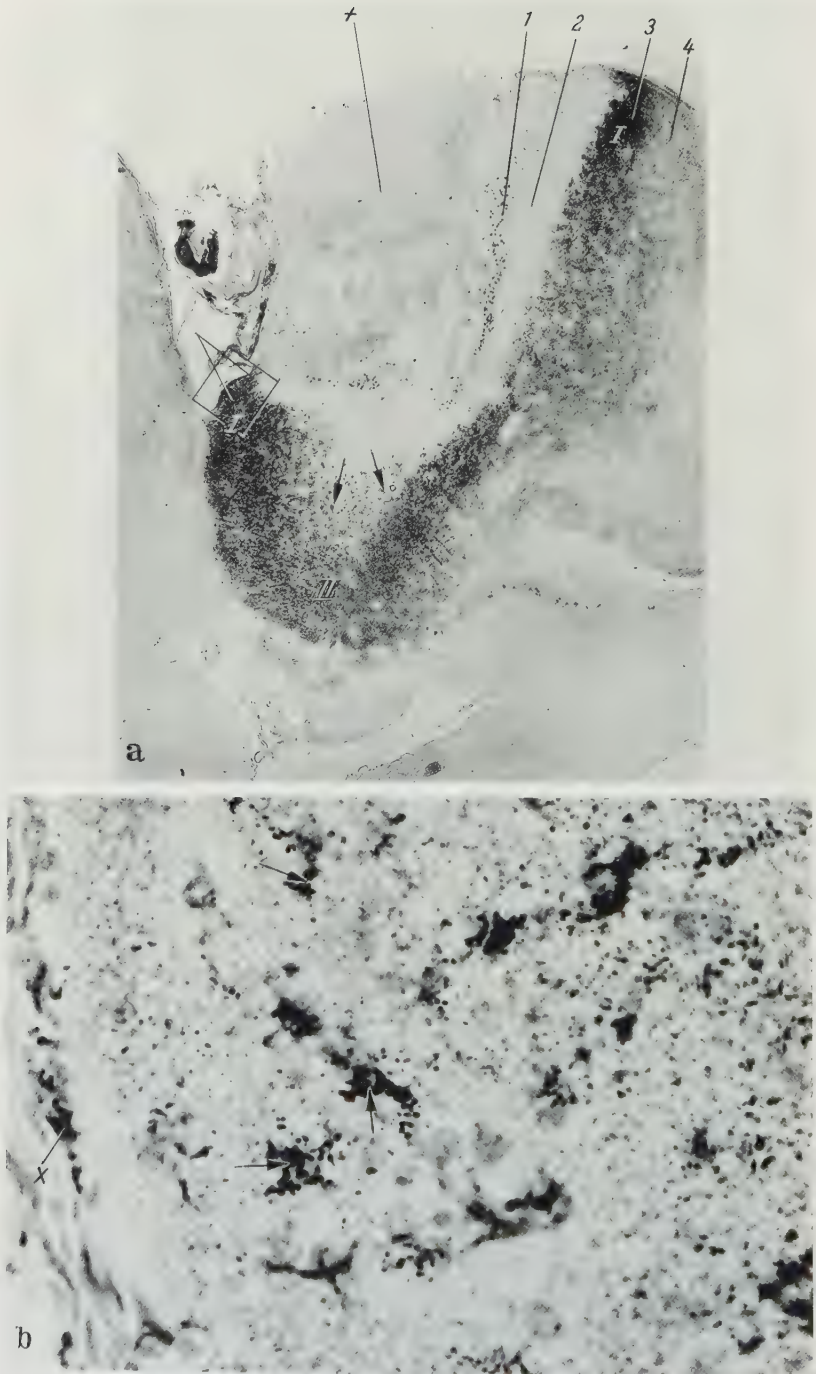


Abb. 10 a u. b. Stichverletzung im Telencephalon der Ratte am 4. Tag nach dem Eingriff. Histochemisches Glykogenpräparat. Frontalschnitte, Rossman fix. (0° C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Übersicht. Vergr. 22fach. + Glykogenfreie Gewebsreste im Inneren des Wundtrichters. 1 Erste, innerste Randschicht mit glykogenreichen Körnchenzellen (schwarze Punkte), 2 zweite, vollkommen glykogenfreie Randschicht, 3 dritte, glykogenreiche Randschicht, 4 allmählicher

Dieses Verhalten stimmt zeitlich mit der Quellung des Ependyms und ihrem Rückgang überein.

7. Sofern operativ verletzt, enthielt der *Plexus chor. ventr. III* kein Glykogen. Dadurch entstand eine scharfe Grenze zwischen beschädigten und normalen Zellen. Auch in der *Paraphyse* der operierten Tiere wurde kein Glykogen nachgewiesen.

Schlußbemerkung. Besonders auffallend ist, daß im ZNS der *Rana temporaria* die postoperative Glykogenbildung nur auf die gliösen Elemente beschränkt blieb. In den Ganglienzellen gab es an keiner Stelle eine Glykogenanreicherung. Eine Deutung der Befunde soll auf breiterer Grundlage in der Schlußdiskussion erfolgen.

2. Zerstörung des feinsten Fortsatzgefüges durch Stichverletzung im Rattenhirn

Ein Hinweis darauf, daß im Säugerhirn im Randgebiet einer Hirnwunde Glykogen angehäuft wird, findet sich in einer Arbeit von HESS (1955) über die „Grundsubstanz“ des ZNS. HESS konnte im Rattenhirn in der Nachbarschaft von Stichwunden mehrere Schichten der Verletzungsrandzone beobachten. Von innen nach außen folgt auf den mit Zelldetritus gefüllten Verletzungskern eine Zone, in der die positive PAS-Reaktion des lichtmikroskopisch homogenen Bereichs, die auf Anwesenheit von Mucopolysaccharid beruhen soll, bis zum 10. Tag nach der Operation vollkommen fehlt. An diesen Saum schließt sich als Übergang zum gesunden Gewebe eine weitere Zone an, die bis zum 4. Tag nach der Operation glykogenhaltig ist. Da HESS in seiner Arbeit nur die Grundsubstanzfrage verfolgt (vgl. Diskussion bei NIESSING und VOGELL 1957, 1960, OKSCHE 1958, KOREY u. a. 1958), schenkt er dem Glykogenbefund keine weitere Beachtung. So geht aus seiner kurzen Bemerkung und den beigegeführten Übersichtsaufnahmen überhaupt nicht hervor, in welchen Feinstrukturelementen dieses Glykogen eingelagert ist. Über den Zelltyp, der maßgebend an der Glykogenanreicherung beteiligt ist, macht HESS keine Angaben. Die bei der Ratte beschriebene Glykogenbildung im Wundrand ist um so auffälliger, weil das Säugerhirn mit ganz vereinzelt regionalen Ausnahmen unter normalen Bedingungen kein histochemisch nachweisbares Glykogen enthält, im Gegensatz zum Froschlirn, in dem stets ein gewisser, unterschiedlich starker Glykogenvorrat nachgewiesen werden kann (OKSCHE 1956/57, 1958).

Aus diesen Gründen mußte der Befund von HESS in eigenen Untersuchungen nachgeprüft und eingehend cytologisch analysiert werden.

Material und Eingriff. Bei einer weiblichen geschlechtsreifen Ratte wurde in Äthernarkose nach einem Hautschnitt eine ausgeglühte Nadel durch die knöcherne Schädeldecke in den linken Frontallappen des Großhirns eingestochen und der Hautschnitt anschließend wieder durch Naht verschlossen. Das Tier überstand den Eingriff sehr gut, zeigte kein von der Norm abweichendes Verhalten und wurde am 3. Tag nach der Operation (18. 10.) in leichter Äthernarkose dekapitiert. Die Betrachtung der freigelegten Gehirnoberfläche unter dem Stereo-Mikroskop zeigte dorsal im Bereich des linken Frontallappens, dicht hinter dem Riechlappen, einen trichterförmig in die Tiefe gehenden Gewebsdefekt.

Übergang zum glykogenfreien Gewebe. *I* Oberflächennahe, durch Hitze einwirkung am stärksten beeinträchtigte Zone, *II* Spitze des Wundtrichters. Die bei ↑ erkennbaren schwarzen Punkte sind glykogenbeladene Astrocyten. Der quadratisch abgegrenzte Bezirk wird in der Abb. 10b bei stärkerer Vergrößerung wiedergegeben. b) Glykogenreiche Astrocyten aus dem in Abb. 10a quadratisch begrenzten Bezirk. Vergr. 532fach. Bei ↑ mit groben Glykogenkörnern beladene Astrocyten mit plumpen, kräftigen Ausläufern. x Glykogenansammlung an der Membr. limit. gliae superfic.

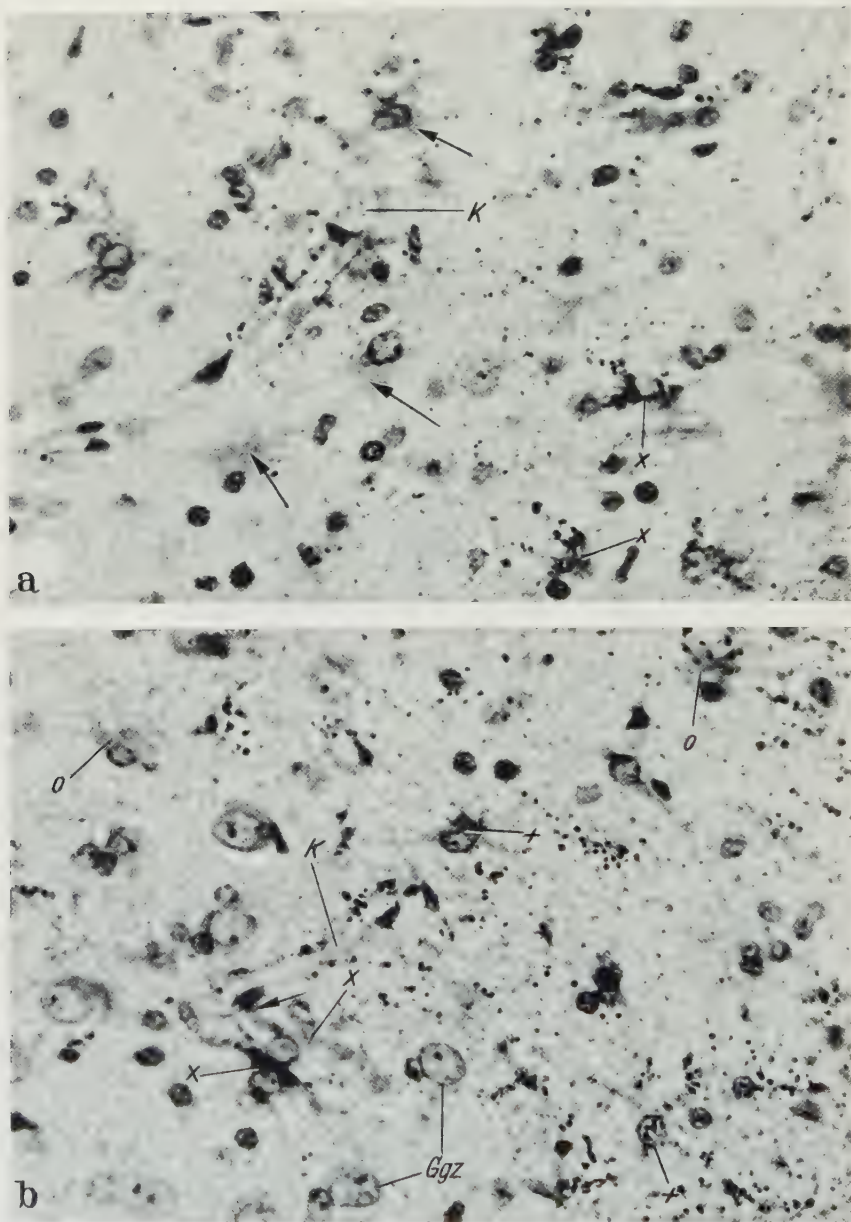


Abb. 11a u. b. Glykogenpräparat aus dem Randgebiet einer Stichverletzung im Telencephalon der Ratte (Objekt wie in Abb. 10). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Glykogenhaltige Astrocyten im Bereich der Wundtrichterspitze. *x* Mit kleinen Glykogenkörnern beladene Astrocyten. Bei \uparrow eine zarte, schleierartige Zeichnung des Zellkörpers, die durch Anwesenheit geringer Mengen fein verteilten Glykogens entsteht. *K* Durch diffus verteilte randständige Glykogenkörnern markierte Kapillare. Der Glykogensaum ist hier, im Gegensatz zu den größeren Gefäßen, nicht durchgehend; die Kapillaren besitzen nur vereinzelte Astrocytenendfüße. Vergr. 558fach. b) Objekt und Methode wie in Abb. 11a. Aus der Nachbarschaft des in Abb. 11a abgebildeten Bereichs. + Astrocyten mit feinen Glykogenkörnern, die das Astwerk deutlich markieren. *o* Schleierartige Astrocyten-Zellkörper mit ganz fein verteiltem Glykogen. *x* Zwei verschieden stark beladene, glykogenhaltige Astrocyten mit deutlichen Gefäßbeziehungen zu einer Kapillare (*K*). \uparrow Glykogenhaltiger Astrocytenendfuß. *Ggz* Ganglienzellen. Vergr. 558fach

Befunde. Der histologische Glykogennachweis mit der Bleitetraacetat-Schiff-Methode ergab einen breiten, die Wundstelle allseitig umgebenden Glykogensaum, der färberisch in einem ganz auffallenden Kontrast zu der glykogenfreien Umgebung stand. Der dorso-ventrale Durchmesser des Frontallappens ist hier noch relativ gering; die Spitze des keilförmigen Wundbereichs (Abb. 10a) war nicht mehr weit von der Hirnbasis entfernt. Gewebstrümmer füllten das Innere des Wundtrichters dicht aus. In diesem sowohl koagulierten, als auch rein mechanisch zerstörten Bereich konnten in Hämalaun-Übersichtspräparaten keine Ganglienzellen oder deren Reste beobachtet werden. Die zahlreich vorhandenen kleinen, chromatinreichen Kerne von ovaler oder runder Gestalt gehörten eindeutig zu Gliazellen. Hier und da war auch das Perikaryon und damit die Gestalt dieser Zellen zu erkennen. Es handelte sich um abgerundete „Körnchenzellen“ mit einer schaumartigen Zytoplasmastruktur. Dieser innere Wundbereich wurde von dem gesunden Gewebe durch eine schmale, wohl nur zum Teil geschädigte Randzone abgegrenzt, für die ebenfalls kleine Gliakerne charakteristisch waren.

Im histochemischen Glykogenpräparat traten die verschiedenen Zonen des Wundrandes noch deutlicher hervor (Abb. 10a). Die das Innere des Wundtrichters füllenden Gewebsreste waren im ganzen glykogenfrei (Abb. 10a). Kleine Glykogenkörnchen wurden hier nur vereinzelt, in Körnchenzellen dargestellt. Dagegen enthielt die erste mit dem gesunden Gewebe zusammenhängende Randschicht, in der keine Ganglienzellen nachgewiesen werden konnten, zahlreiche große, mit Glykogen beladene Körnchenzellen (Abb. 10a). Neben den glykogenhaltigen Körnchenzellen fanden sich aber auch glykogenfreie, die ein schaumiges Zytoplasma aufwiesen. Auf diese innerste Randschicht folgte eine zweite, vollkommen glykogenfreie, in der das Bild wieder von Ganglienzellen beherrscht wurde (Abb. 10a). An die letztere schloß sich ohne allmählichen Übergang eine dritte, gefäßreiche Randzone an, in der ungewöhnlich viel Glykogen eingelagert war (Abb. 10a). Dieses glykogenreiche Grenzgebiet ging allmählich in das glykogenfreie, unbeeinträchtigte Gewebe über.

Welche Bauelemente des ZNS sind die Träger dieses Glykogens? Genaue Durchmusterung der 3. Randzone zeigte, daß die Ganglienzellen glykogenfrei sind. Eine auffallend dichte Ansammlung von Glykogenkörnchen lenkte die Aufmerksamkeit auf die Membr. limit. gliae superfic. und noch mehr auf die Membr. limit. gliae perivasc. (Abb. 10b), an die sich häufig ein breiter, intensiv gefärbter Randwall anschloß. Dieser Glykogensaum hob Gefäße verschiedenen Kalibers hervor, von den in Piatrichtern liegenden stärkeren Gefäßstämmen bis zu Arteriolen und Kapillaren. Durch die Darstellung feiner, aneinander gereihter Glykogenkörnchen waren die Fortsätze der Astrocyten oft in ihrer ganzen Länge, vom Perikaryon bis zum stempelartigen Endfuß zu verfolgen (Abb. 11b). Die intrazelluläre Lagerung des Glykogens wurde dadurch klar veranschaulicht. Sofern nur eine starke Glykogenanreicherung vorlag, gelang es mit der Bleitetraacetat-Schiff-Methode die Form und den Verzweigungstyp dieser Astrocyten genau so gut zu erfassen wie durch die Silberimprägnation. Verschiedene Astrocytenformen wurden beobachtet.

In der Nähe der Einstichstelle, in der Nähe der äußeren Oberfläche des Gehirns, wo der durch Hitzewirkung zugefügte Schaden am stärksten war, dominierten Astrocyten mit plumpen kräftigen Ausläufern (Abb. 10b). Diese mit groben

Glykogenkörnchen beladenen Zellfortsätze verdämmerten allmählich in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich, der ebenfalls Glykogen enthielt. Auf einem homogen roten Untergrund waren hier zuweilen kettenartige Anordnungen von Glykogenkörnchen sichtbar (Abb. 10b), die man aber nicht mehr lichtmikroskopisch deutlich erkennbaren Ausläuferstrukturen zuordnen konnte. Der reaktionsfähige Stoff wurde durch Digerierung mit Diastase oder Saliva so einwandfrei entfernt, daß ein anderes Polysaccharid, Mucoproteid oder Glykolipid mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Nach der Spitze des Wundtrichters zu ließ die Reaktions-Farbintensität allmählich nach; die in der Tiefe verstreut liegenden Glykogenkörnchen waren hier wesentlich feiner als in den oberflächlichen Bereichen. Die Astrocyten, die in der Tiefe der Wunde dargestellt wurden, hatten einen wesentlich zarteren Zelleib und ein feineres Astwerk (Abb. 11a, b). Sie wiesen eine sehr feinkörnige, fast homogene Füllung mit Glykogen auf. Entsprechen diese Astrocyten ihrer Form nach noch weitgehend dem aus Silberpräparaten bekannten normalen Zellbild, so erinnern die in der Nähe der stark koagulierten Oberfläche lokalisierten Zelltypen an den von NISSL und ALZHEIMER beschriebenen Gliarassen. Eine Reihe von glykogengefüllten Astrocyten ähneln den zuerst von NISSL beschriebenen „gemästeten Formen“. Diese werden als Ausdruck einer progressiven Veränderung der protoplasmatischen Glia aufgefaßt. Ausgesprochene Riesenastrocyten („Monstrezellen“) wurden nicht beobachtet. Über geschwollene Astrocyten in der Umgebung von experimentellen Stichwunden wird auch in der elektronenmikroskopischen Studie von DE ROBERTIS, GERSCHENFELD und WALD (1960) berichtet. In Hinblick auf das Grundsubstanzproblem (s. S. 309) und die Frage nach der Glykogenlokalisation in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich (s. S. 349, 351) ist es wesentlich, daß ein echter extracellulärer Raum auch unter diesen Bedingungen nicht auftrat. Die Schwellung betraf hauptsächlich das Zytoplasma der Astrocyten. Über die Reaktion der Astrocyten im Randbereich von Hirnwunden s. auch PENFIELD (1932), ADAMS (1958) und PALAY (1958).

Schlußbetrachtung. Das Strukturbild der glykogenreichen Grenzzone der Stichwunde erscheint besonders bemerkenswert durch die „rasenartige“ Ausbreitung der Astrocyten. Ohne Kenntnis der elektronenmikroskopischen Strukturverhältnisse (s. die am Rattenmaterial erhobenen Befunde von DEMPSEY und LUSE 1958, PALAY 1958, sowie HARTMANN 1958) hätte man hier auf einen synzytialen zytoplasmatischen Zusammenhang der einzelnen Zellen schließen können. Die Intensität der histochemischen Glykogenreaktion wird in Richtung auf die Gefäße immer stärker, bis die maximale Körnehendichte an der Membr. limit. gliae perivasc. erreicht ist. Das Zellbild der glykogenreichen Glia in der äußersten (dritten) Randschicht der Wunde ist so typisch für Astrocyten, daß eine Verwechslung mit Oligodendrocyten oder Hortega-Zellen nicht möglich ist. Sofern es sich aber um die innerste (erste) Randschicht handelt, ist es nicht möglich zu entscheiden, ob nicht zumindest ein Teil der glykogenhaltigen Körnchenzellen von Hortega-Zellen her stammt. Das Wesentliche des Operationsbefundes bei der Ratte läßt sich in den folgenden 3 Punkten zusammenfassen:

1. In einer Schicht des Wundrandes, die zwischen dem abgestorbenen bzw. schwer geschädigten und dem gesunden Gewebe liegt, wird in den ersten Tagen nach dem Eingriff viel Glykogen gebildet.

2. Diese Glykogenbildung erfolgt fast ausschließlich in den Astrocyten.
3. Der Formwandel der Astrocyten geht mit einer Alteration des Zellstoffwechsels einher.

V. Glykogennachweis in der Tumorrandozone des menschlichen Gehirns

Es erscheint wesentlich, die bei der Ratte gemachten Beobachtungen auch noch durch Befunde am menschlichen Gehirn zu ergänzen. Ein direkter Vergleich mit dem Tierversuch wäre nur in der Umgebung von frischen Hirnwunden gegeben. Für den exakten histochemischen Glykogennachweis kommt nur lebensfrisch fixiertes Gewebe in Frage. Ein solches Wundmaterial stand aber nicht zur Verfügung. In der Randzone von Hirntumoren können in bezug auf den Stoffaustausch Verhältnisse vermutet werden, die dem Zustand im Wundrand annähernd entsprechen. Es ist anzunehmen, daß auch durch die Kompression, die das Vordringen eines Tumors auf seine Umgebung ausübt, der Bereich der allerfeinsten, nur elektronenmikroskopisch sichtbaren Verzweigungen funktionell beeinträchtigt wird.

FRIEDE (1957) untersuchte in 49 Fällen operativ exziierte Stückchen aus dem Großhirn und Kleinhirn (Umgebung von Tumoren und posttraumatischen Narben) histochemisch auf Glykogen. In $\frac{2}{3}$ der Fälle lag eine Glykogenanreicherung vor, die sich sowohl auf Ganglien-, als auch auf Gliazellen erstreckte, mit besonderer Betonung des perivaskulären Bereichs. FRIEDE sieht in dieser Glykogenanreicherung einen pathologischen Vorgang, der mit der Frequenzverlangsamung im EEG-Grundrhythmus zusammenhängt.

Glykogen wurde im menschlichen Gehirn bereits früher erfolgreich histologisch nachgewiesen. Eine Zusammenfassung der älteren Literatur ist bei CASAMAJOR (1909) zu finden. Intrazelluläres Glykogen konnte im Sektionsmaterial des ZNS bei sehr verschiedener Todesursache dargestellt werden. Aus diesem Grunde fragte CASAMAJOR, ob das Glykogen nicht einen normalen Bestandteil des Nervensystems darstellt.

OKSCHE (1958) untersuchte lebenswarm konservierte Gewebstückchen aus dem Frontalhirn, die bei einem 60jährigen Mann entfernt wurden, um zu einem tief gelegenen, fronto-parietalen Tumor (Glioblastoma multiforme) zu gelangen. Die histochemische Untersuchung ergab eine starke Glykogenablagerung nur im Bereich der Membr. limit. gliae superfic. und perivasc., also in gliösen Differenzierungen. Auch das Perikaryon einiger marginaler Gliazellen enthielt Glykogenkörnchen. Von den Ganglienzellen erwiesen sich als glykogenhaltig nur die großen Pyramidenzellen der III. und V. Schicht der Großhirnrinde. Da dieses Material aber nur tumorferne Rindenabschnitte erhielt, war die Beurteilung der innersten Lagen des Tumorrandes nicht möglich.

1. Randzone einer Hypernephrom-Metastase bei einer 54jährigen Frau

Material. Gewebstückchen, die dem Temporallappen einer 54jährigen Patientin operativ entnommen wurden. Aus der Krankengeschichte (Oberarzt Dozent Dr. PLA, Gießen) sind die folgenden Angaben von Bedeutung:

„Im Juni wurde die rechte Niere wegen eines Hypernephroms entfernt. Seit 3—4 Monaten Klagen über Kopfschmerzen, Nachlassen der geistigen Leistungsfähigkeit und Antriebslosigkeit. Bei der Untersuchung beiderseits ausgeprägte Stauungspapille, angedeutete Rechtsbetonung der Armreflexe, deutliche Wortfindungsstörungen, leichte Agraphie und ausgeprägte

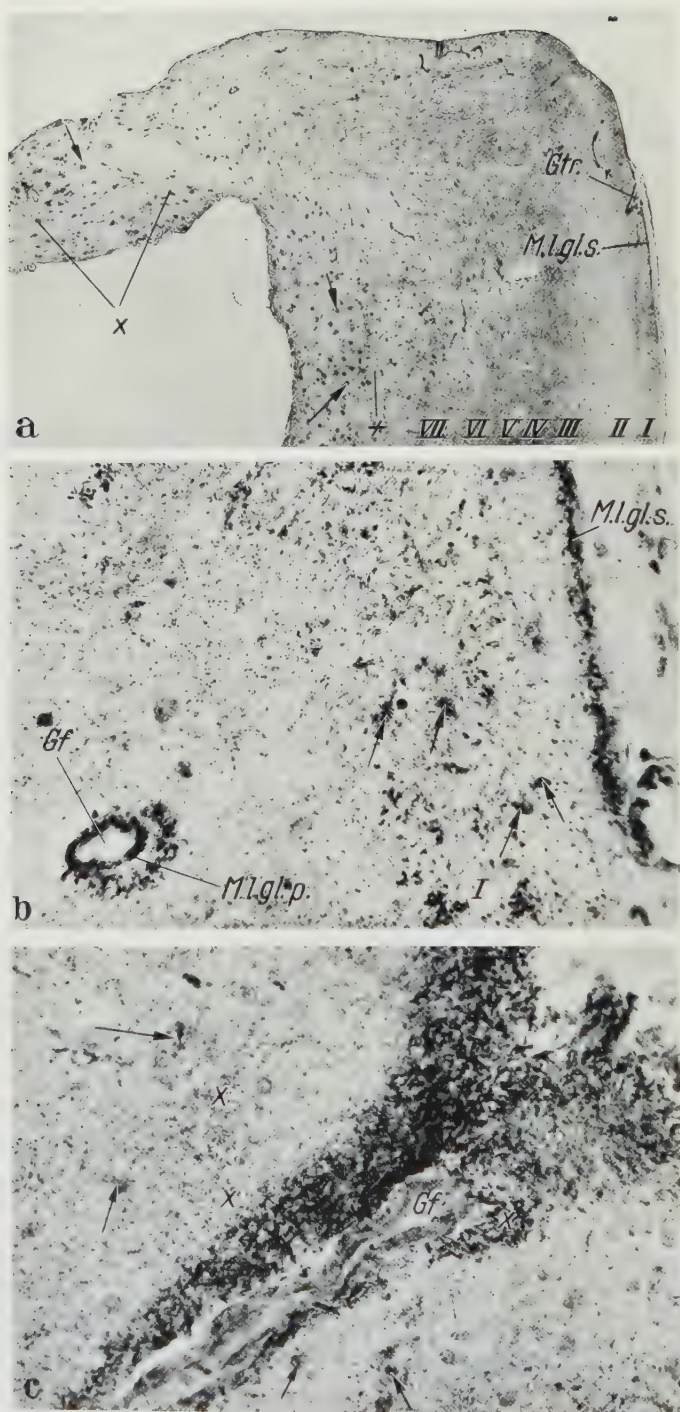


Abb. 12a—c. Histochemische Glykogen Darstellung in der Tumorrundzone des menschlichen Gehirns. a und b Randzone einer Hypernephrom-Metastase (54jährige Frau). Rossman fix. (0° C). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. a) Übersicht. Gyrus temporalis med. Vergr. 22fach

Apraxie, im EEG schwere Veränderungen links temporal. Arteriographie links: Angefärbter Tumor links temporal. 11. 7. 58 Exstirpation einer kastaniengroßen Metastase. Das histologische Bild ergab eine Hypernephrom-Metastase, das umgebende Gewebe zeigte die Zeichen des Hirnödems. Der postoperative Heilverlauf war komplikationslos.“

Für den Glykogennachweis habe ich Teile der 2. und 3. Temporalwindung, die bei der Freilegung des Tumors entfernt werden mußten, sehr vorsichtig in etwa 2 mm dicke Scheiben zerlegt. Bei der Zergliederung fiel die auffallend weiche Konsistenz des Gewebes auf. Bereits 1–3 min nach der Exzision wurde mit der Fixierung nach ROSSMAN (0° C) begonnen.

Befunde. Der Ausfall der Bleitetraacetat-Schiff-Reaktion, die lautend mit Diastasetest kontrolliert (s. Abb. 14a, b) wurde, zeigte eine sehr starke Glykogenanhäufung im exzidierten Hirngewebe. Eine besondere Beachtung verdient die Lokalisation dieses Glykogens.

Durch einen ganz besonderen Glykogenreichtum zeichnete sich der Bereich der beiden Membranae limitantes gliae aus. Mit kleinen Glykogenkörnern beladene Astrocytenfortsätze strebten zur Membr. limit. gliae superfic. und zu den Gefäßtrichtern. Ein randständiger Glykogenwall markierte außerdem alle kleineren Rindengefäße. (Zur Frage der Membranae limitantes gliae in der menschlichen Großhirnrinde s. BAIRATI 1958, vgl. NIESSING 1950/51, sowie NIESSING und ROLLHÄUSER 1953/54.) Die Lokalisation des Glykogens beschränkte sich nicht nur auf diese terminalen Differenzierungen der Glia. Bei einer ganzen Reihe von marginalen Astrocyten enthielt das Perikaryon so viel Glykogen, daß der Umriß der Zelle deutlich zu erkennen war. Eine diffuse Farbreaktion der Rinde sprach außerdem für eine Glykogeneinlagerung in den nur elektronenmikroskopisch darstellbaren feinsten Zellausläufern (vgl. den elektronenmikroskopischen Befund von NIESSING und VOGELL 1960, an demselben Exzisionsmaterial). Diese fast homogen erscheinenden Glykogenmassen waren aber nicht gleichmäßig über die ganze Großhirnrinde verteilt, sondern zeigten deutliche Mengenunterschiede, die der morphologischen Gliederung der Rindenschichten entsprachen. Aus diesem Grunde muß jede Schicht für sich besprochen werden, indem u. a. auch auf das zahlenmäßige Verhältnis der Strukturelemente (Ganglienzellen — Gliazellen) geachtet wird.

Die *I. Schicht der Großhirnrinde (Molekularschicht)* ergab von allen die stärkste Glykogenreaktion. Sie ist besonders reich an Gliazellen, enthält dagegen nur relativ wenige Ganglienzellen. Dieser Befund ist ein neuer Hinweis darauf, daß die Glykogenbildung im ZNS in erster Linie auf die Tätigkeit der Gliazellen zurückzuführen ist (Abb. 12a, b, c).

Die beschriebene glykogenreiche Zone hörte ziemlich scharf an der Grenze zur *II. Rindenschicht (äußere Körnerschicht)* auf. Die letztere war auffallend glykogenarm (Abb. 12a).

M.l.gl.s. Membrana limit. gliae superfic. *Gtr.* Gefäßtrichter. *I—VII* Schichten der Großhirnrinde, die je nach ihrem Glykogengehalt einen verschiedenen intensiven Reaktions-Farbtönen aufweisen. + Rinden-Mark-Grenze. Die schwarzen Punkte, auf die ↑ hinweisen, sind große glykogenhaltige Astrocyten. *x* Tiefe, tumornahe Marksicht mit Riesenastrocyten (↑). *b*) Glykogenreiche Molekularschicht (*I*) der Großhirnrinde bei stärkerer Vergrößerung. Gyrus temporalis inf. Vergr. 350fach. *M.l.gl.s.* Membr. limit. gliae superfic. ↑ weisen auf glykogenreiche Gliazellen. Die kleinsten Glykogenkörnern (schwarz) liegen in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich der feinsten Verzweigungen. *Gf* Gefäß mit Glykogenwall an der Membr. limit. gliae perivasc. (*M.l.gl.p.*). *c*) Randzone eines Glioblastoma multiforme (60jähriger Mann). Rossman fix. (Zimmertemperatur). Bleitetraacetat-Schiff-Methode. Saures Hämalaun. Vergr. 350fach. Gyrus front. med. Gefäßtrichter mit Glykogenanreicherung in der Randzone, insbesondere an der Membr. limit. gliae superfic. *Gf* Gefäß. Bei ↑ glykogenhaltige Gliazellen. *x* Streifige Zeichnung, verursacht durch glykogenhaltige Gliaausläufer

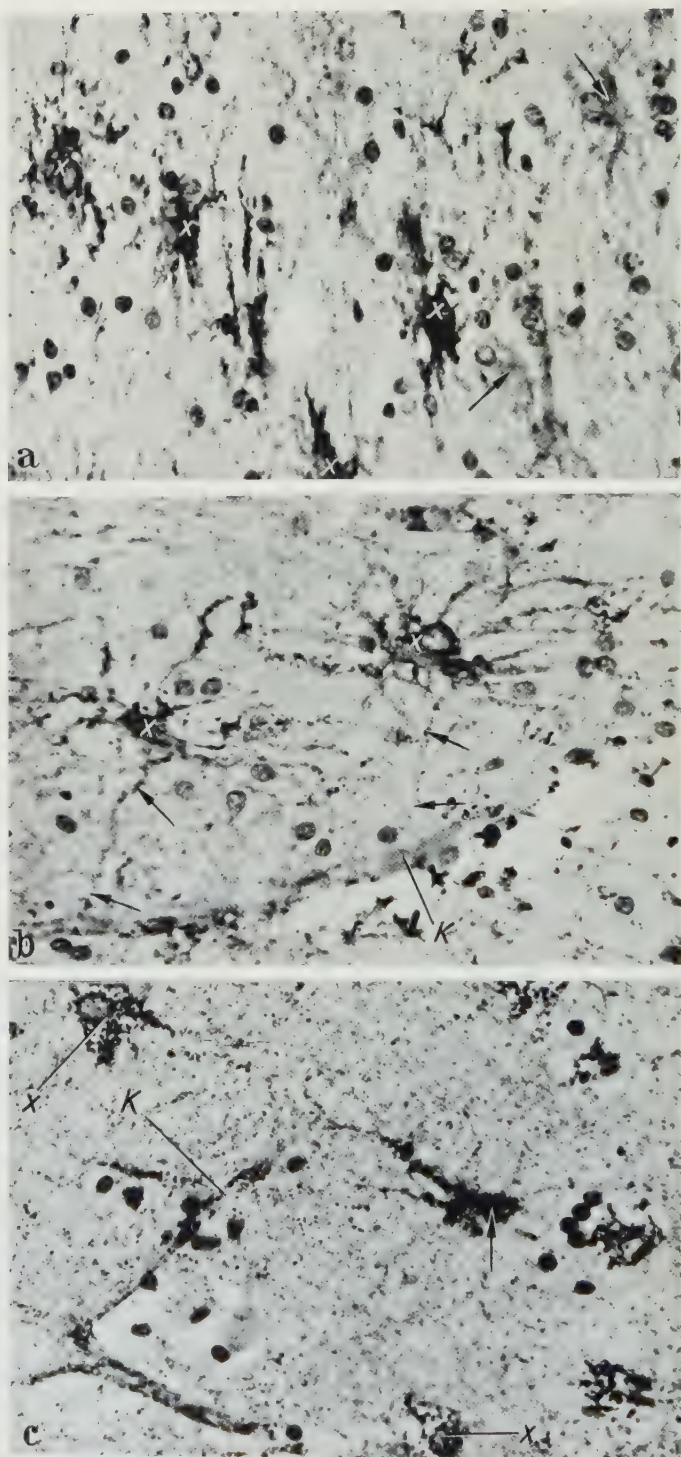


Abb. 13a—c. Glykogenreiche Riesenaströcyten aus der Randzone einer Hypernephrom-Metastase (54jährige Frau, Material wie in Abb. 12a, b). Rossman fix. (0°C), Bleitetraacetat-Schiff-Methode.

Wenig Glykogen fand sich auch in der *III. äußeren Pyramidenschicht* (Abb. 12a). In dem aufgearbeiteten Material war die Struktur der Pyramidenzellen nicht ganz typisch. Diese hatten nach Rossman-Fixierung ein gequollenes, blasiges Aussehen, das aber nicht auf Anwesenheit von Glykogen beruhte (Zeichen des Hirnödems?); die feinen diffus verteilten Glykogenkörnchen hörten scharf am Zelleib der Ganglienzelle auf. Die Reaktions-Farbintensität der III. Schicht stellte einen Übergang von der II. zur IV. Schicht dar. In Richtung auf die IV. Schicht nahm die Zeichnung der Glykogenkörnchen immer stärker zu.

Die *IV. innere Körnerschicht* war relativ glykogenreich, ohne daß die Glykogenmenge der I. Schicht auch nur annähernd erreicht wurde (Abb. 12a).

Die *V. innere Pyramidenschicht* wies im Vergleich zur vorausgegangenen wieder weniger Glykogen auf. Sofern hier glykogenreiche Zellen vorkamen, handelte es sich um Astrocyten. Im Perikaryon der großen Ganglienzellen ließ sich dagegen kein Glykogen nachweisen. In der inneren Pyramidenschicht wurde ein herdförmiger Ausfall der Glykogenreaktion beobachtet; glykogenreichere und -ärmere Areale gingen ohne scharfe Begrenzung ineinander über. Das Glykogenmaximum fand sich an den Gefäßen, wobei die Astrocytenendfüße stellenweise sehr deutlich hervortraten (Abb. 12a).

Die *VI. multiforme* und *VII. Grundsicht* verhielten sich ähnlich wie die V. Schicht (Abb. 12a). Allerdings nahm die Menge der diffus verteilten Glykogenkörnchen in der Richtung auf die weiße Substanz allmählich zu (Abb. 13a). Glykogenhaltige Astrocyten wurden immer zahlreicher und stärker gefüllt. Der Glykogenwall an der Membr. limit. gliae perivasc. erfuhr hier eine zunehmend stärkere Ausbildung. An der Grenze zwischen der weißen und grauen Substanz trat stellenweise eine Anordnung glykogenreicher Astrocyten hervor, die man als „Gliarasen“ bezeichnen kann. Diese Zellformationen bildeten einen Übergang in die weiße Substanz, in der dicht gelagerte astrocytäre Riesenformen vom Typ der großen Spinnenzellen und „Monstrezellen“ dominierten (Abb. 13b, 14a). Diese zeichneten sich u. a. auch durch ihren ungewöhnlich großen Zellkern aus und waren mit Glykogen prall gefüllt, aber lipidarm. Ihre Gefäßbeziehungen (Abb. 13b und c) traten sehr deutlich hervor; die perivaskuläre Glykogenanhäufung ging über das sonst beobachtete Maß weit hinaus. NIESSING und VOGELL (1960) weisen auf die deutliche Quellung der Astrocytenfortsätze und der perivaskulären Endfüße hin, die elektronenmikroskopisch in diesem ödematösen Material sichtbar ist. Eine Erweiterung der extrazellulären Spalträume lag dagegen nicht vor.

2. Randzone eines Glioblastoma multiforme bei einem 60jährigen Mann

Über einen Teil dieses Materials wurde bereits früher berichtet (OKSCHE 1958). Neu angefertigte lückenlose Serien gaben jetzt einen Einblick in den Zustand der tieferen Zonen, die bei der Erstuntersuchung nicht erfaßt wurden. Außer den

Saures Hämalalaun. Das in Abb. 13b gezeigte Gebiet stammt aus der in Abb. 12a mit *x* gezeichneten tiefsten Marksicht des exzidierten Stückchens. Die in Abb. 13a und c abgebildete Zone liegt näher an der Rinden-Mark-Grenze. a) Rasenartiger Verband proliferierter glykogenreicher Astrocyten. *x* Mit scholligem Glykogen beladene Astrocyten. ↑ Astrocyten mit einem zarten, homogenen Reaktionsfarbton im Cytoplasma. Vergr. 448fach. b) Glykogenreiche Riesenastrocyten (*x*) mit deutlich erkennbaren Gefäßbeziehungen. *K* Kapillare. Bei ↑ Astrocytenfortsätze, die in ihrer ganzen Ausdehnung bis zur Kapillare erfaßt werden. Vergr. 448fach. c) Mit groben Glykogenkörnchen beladene Astrocyten. Die mit ↑ gezeichnete spinnenförmige Zelle entsendet Fortsätze zu einer Kapillare (*K*). *x* Plumpere, stärker abgerundete Astrocytenformen. Vergr. 448fach

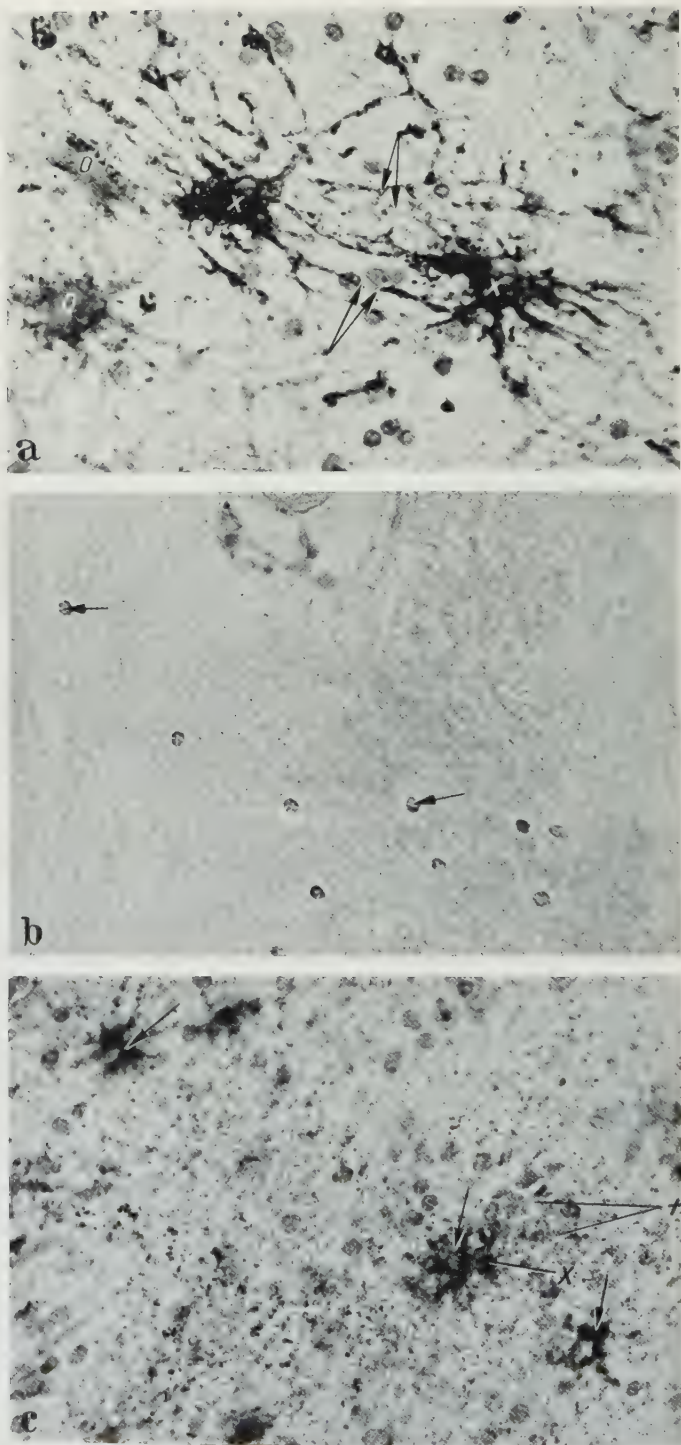


Abb. 14a—c. Glykogenreiche Astrocyten in der Tumorrandzone des menschlichen Gehirns. Rossman fix. (a und b: 0° C, c: Zimmertemperatur). Bleitetraacetat-Schiff-Reaktion. a und b Randzone einer

früher beobachteten glykogenreichen Strukturen: 1. den marginalen Gliazellen, 2. der Umgebung der Membr. limit. gliae superfic. und 3. Membr. limit. gliae perivasc., wurden jetzt auch noch große, zytoplasmatische Astrocyten (Abb. 14c) an der Rinden-Mark-Grenze nachgewiesen. Sie waren besonders zahlreich in der weißen Substanz und ließen dort einwandfreie Gefäßbeziehungen erkennen. Im Vergleich zu dem untersuchten Randgebiet der Hypernephrom-Metastase enthielt dieses Objekt keine Riesenastrocyten; die Gefäßwand war wesentlich ärmer an Glykogenkörnchen. Dafür wurde aber Glykogen in den Ganglienzellen (Pyramidenzellen) der III. und V. Rindenschicht nachgewiesen; neben glykogenhaltigen Nervenzellen gab es aber auch glykogenfreie. Dieses Material ergab keinen Anhaltspunkt für ein Hirnödem.

In der Gewebekultur gezüchtete Tumor- und normale Astrocyten (aus Biopsiematerial) enthalten nach LUMSDEN (1958) kein Glykogen. Sie bilden eine andere PAS-positive Substanz, die zu den Mucoproteiden oder Mucopolysacchariden gehört. Diese Substanz kann aus den Zellen in das umgebende Kulturmedium abgeschieden werden. Die am eigenen Operationsmaterial beschriebene PAS-positive Substanz wurde dagegen eindeutig durch Diastase abgebaut.

Schlußbetrachtung. Es fiel im menschlichen Hirn auf, wie mit der Verringerung des Abstandes vom Hirntumor bzw. Metastase, die Astrocyten immer stärker von der Norm im Sinne einer progressiven Proliferation abweichen. Die zunehmende Glykogenbildung spricht dafür, daß der proliferative Formwandel der Astrocyten von grundlegenden zytochemischen Veränderungen begleitet ist. Ein weiteres Zeichen der gesteigerten Zellaktivität ist der stark vergrößerte Zellkern. Über die progressiven Veränderungen der Astrocyten aus der Sicht der modernen Neuropathologie s. ADAMS (1958). Nach ADAMS ist die Entstehung und Bedeutung der astrocytären Riesenformen wenig verstanden. Es handelt sich offenbar um eine reaktive Zellform mit gesteigerter Aktivität (s. auch PALAY 1958), die erst später im Verlauf eines krankhaften Prozesses der Degeneration anheimfällt.

Eine Andeutung der oben beobachteten progressiven Formenreihe war auch im verwundeten Rattenhirn zu erkennen. In der Tiefe, an der Spitze des Wundtrichters fanden sich, der geringen Zerstörung entsprechend, Astrocyten von annähernd normaler Gestalt, die nur relativ wenig Glykogen enthielten. Diese Astrocyten wurden in der Nähe der stärker beeinträchtigten äußeren Oberfläche von größeren, mit grob granuliertem Glykogen überladenen Spinnenzellen abgelöst. Solche Astrocyten enthalten nach den elektronenmikroskopischen Befunden von PALAY (1958) im Vergleich zu normalen Formen auch größere Mengen Ribonucleoproteid. Bei der Gegenüberstellung der menschlichen Hirnrinde aus dem Tumorrandgebiet mit der Wundrandzone des Rattengehirns erinnerten die kleineren, spinnenförmigen Astrocyten der V. bis VII. Rindenschicht sowohl der Form, als auch der Glykogenverteilung nach an die glykogenreichen Ratten-Astrocyten des oberflächennahen Wundrandbereichs. Im Rattenhirn fehlten die Riesenastrocyten. Vielleicht spielt hier der Zeitfaktor eine nicht zu unterschätzende

Hypernephrom-Metastase (54jährige Frau). Gyrus temporalis med. a) Zwei mit Glykogen überladene Riesenastrocyten (x). Stark positiv reagierender Inhalt der Fortsätze, die sich bei ↑ berühren. o Zwei Zellen, die nur im Perikaryon Glykogenkörnchen enthalten. Vergr. 448fach. b) Parallelschnitt zur Abb. 14a und 13b nach vorausgegangener Behandlung mit Diastase. Von den Riesenastrocyten ist nur der Zellkern (↑) zu erkennen. Vergr. 448fach. c) Randzone eines Glioblastoma multiforme (60jähriger Mann). Gyrus frontalis med. Glykogenhaltige Astrocyten (↑) aus einem rindennahen Markbereich. Im Vergleich zu den in Abb. 13b und 14a abgebildeten Formen weniger stark proliferiert. Die groben Glykogenkörnchen (x) liegen meist in gut erkennbaren, stärkeren Zellfortsätzen, die feinsten Stäubchen (+) dagegen in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Strukturbereich. Vergr. 448fach

Rolle; ein Tumor entwickelt sich über einen längeren Zeitraum. Ob in dem beschriebenen Material die Entstehung der Riesenastrocyten in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem Hirnödeme steht, kann hier nicht entschieden werden.

Zur Frage des „Hirnödems“ und der „Hirnschwellung“, sowie zu dem reaktiven Verhalten der Astroglia (Vergrößerung, Klastomatodendrose) s. PENFIELD (1932), ZÜLCH (1943), REICHARDT (1957), vgl. auch SPATZ (1929), JACOB (1940), HALLERVORDEN (1941), HALLERVORDEN und QUADBECK (1957), NIESSING und VOGELL (1960). Beim Hirnödem zeigt die Glia eine progressive Reaktion, die mit einer Vergrößerung der Zellen einhergeht (ZÜLCH 1943).

VI. Bemerkungen über glykogenhaltige Gliazellen bei der Glykogenspeicherkrankheit

Die Glykogenspeicherkrankheit kann heute nicht mehr als ein einheitliches Krankheitsbild angesehen werden. Nach G. T. CORI (1957) gibt es mindestens vier verschiedene Krankheitstypen, die entweder durch einen Mangel der am Glykogenstoffwechsel beteiligten Enzyme oder durch abnorme Struktur des baumartig verzweigten Glykogenmoleküls charakterisiert sind.

Typ 1 weist einen Mangel der Glucose-6-Phosphatase auf, die Glykogenstruktur ist dagegen normal. *Typ 2* zeigt ebenfalls eine normale Glykogenstruktur. Da aber ein Enzymmangel bisher nicht festgestellt werden konnte, ist diese Gruppe noch rätselhaft. Beim *Typ 3* ist das Glykogenmolekül abnorm gebaut; die äußeren Äste fehlen oder sind sehr kurz. Das gestörte Enzym ist die Amylo-1-6-Glucosidase („debrancher“-Enzym). *Typ 4* zeichnet sich durch besonders lange innere und äußere Äste des Glykogenmoleküls aus; die Störung betrifft die 1,4—1,6-Transglucosidase („brancher“-Enzym).

Weitere Ausführungen über die biochemischen Grundlagen der Glykogenspeicherkrankheit s. G. T. CORI (1952), CORI und CORI (1952), ILLINGWORTH, LARNER und CORI (1952), ILLINGWORTH und CORI (1952), ILLINGWORTH, CORI und CORI (1956), HAUKE, ILLINGWORTH, BROWN und CORI (1959). Klinische Literatur s. ZELLWEGER (1956).

Die klinischen Symptome der Glykogenspeicherkrankheit können von Fall zu Fall stark wechseln (vgl. ZELLWEGER 1956). Die abnorme Glykogenspeicherung bevorzugt die folgenden Organe: Leber, Skelettmuskulatur, Herz und Niere. Sie ist teilweise von degenerativen Erscheinungen begleitet. Im ZNS kam eine abnorme Glykogenspeicherung in den von SELBERG, CLEMENT, sowie CHILDS beschriebenen Fällen vor (vgl. ZELLWEGER 1956).

Bei den beiden von SELBERG (1953) sezierten Säuglingen (Geschwistern) wurde (in Zusammenarbeit mit JACOB) eine eingehende histologische Untersuchung des ZNS durchgeführt. SELBERG (S. 313) beobachtete, daß große, mit Glykogen stark beladene Ganglienzellen besonders im Vorderhorn des Rückenmarks und in den motorischen Kerngebieten des Hirnstamms (Accessoriuskern, Nucl. ambiguus, Hypoglossus- und Facialiskern) hervortraten. Dagegen zeigten die Ganglienzellen der Großhirnrinde nur geringe Glykogenmengen. (Weitere Angaben s. SELBERG, S. 313—315.) „Die gesamten Ependymzellen und die großkernige Myelinisationsglia (Astrocyten), wie auch die Oligodendroglia sind mit feintropfigem Glykogen vollgestopft, ohne — abgesehen von einer gelegentlichen Vergrößerung — strukturelle Schäden davonzutragen. Die Fortsätze der Astrocyten sind so gleichmäßig mit Glykogen gefüllt, daß sie sich im Best-Karmin-Präparat vorzüglich darstellen“ (SELBERG). In Holzer-Präparaten wies SELBERG eine erhebliche diffuse Gliose in allen Abschnitten des Rückenmarks nach.

Die biochemische Bestimmung des Glykogengehaltes ergab bei einem der Säuglinge im Rückenmark 0,75 g. % Glykogen, im Gehirn: a) in der weißen Substanz 0,9 g. %, b) in der

grauen Substanz 0,4 g-% Glykogen. Die Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels wurden nicht bestimmt.

Über die neurologischen Symptome s. SELBERG (S. 308).

Dank dem freundlichen Entgegenkommen von Herrn Professor JACOB, Marburg, war es mir möglich, Großhirn- und Medullaschnitte des von SELBERG bearbeiteten Hirnmaterials mit meinem Untersuchungsgut zu vergleichen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß das Material SELBERGS methodisch anders aufgearbeitet war (Alkoholfixierung, Best-Karmin).

Das Glykogenbild der Großhirnrinde der an Glykogenspeicherkrankheit gestorbenen Säuglinge erinnerte weitgehend an den in dieser Studie beschriebenen Befund im Randgebiet von Hirntumoren (insbesondere bei der Hypernephrom-Metastase), nur die Riesenform der Astrocyten trat nicht in Erscheinung. Aber auch in der Wundrandzone des Rattenhirns oder im ZNS winterschlafender Siebenschläfer und Igel konnte ich ähnliche morphologische Stadien glykogenbeladener Astrocyten beobachten wie im Gehirn der von SELBERG seziierten Säuglinge. Nur ist die Glykogenspeicherung im Winterschläferhirn wieder reversibel (s. S. 319). Dasselbe gilt auch für die Randzone von Hirnwunden (HESS 1955). Besonders viele zytoplasmareiche, glykogengefüllte Astrocyten wies im Material SELBERGS die weiße Substanz auf. Neben granulär verteiltem Glykogen kamen im Astrocytenzytoplasma auch zarte Körnchenschleier vor. (Beide Verteilungstypen s. Abb. 11a dieser Studie). Sehr deutlich trat die Glykogenanreicherung an der Membr. limit. gliae perivasc. hervor. In der Medulla oblongata enthielt der Zellverband des Olivenkerns grobgranulierte Astrocyten, in den zytoplasmareicheren Astrocyten der weißen Substanz dominierte dagegen das fast homogene Glykogenbild.

Ob auch im Winterschlaf oder in der Randzone von Hirnwunden eine vorübergehende Hemmung der am Glykogenstoffwechsel beteiligten Enzyme vorliegt, kann in der Zukunft nur mit biochemischen Methoden geklärt werden. Die morphologischen Parallelen in der regionalen Verteilung der glykogenhaltigen Ganglienzellen, insbesondere aber im Verhalten der Astrocyten, sind auffallend.

VII. Deutung der Glykogenbefunde im ZNS

Nach den Ergebnissen biochemischer Untersuchungen enthält das Säugerhirn nur eine geringe Glykogenreserve, die bei Hypoglykämie rasch erschöpft wird (LEUTHARDT 1957). Aus diesem Grunde ist die Skepsis verständlich, mit der der Biochemiker von vornherein dem Ergebnis des histochemischen Glykogenachweises in den Strukturen des ZNS entgegentritt. Unter normalen Bedingungen ist das Säugerhirn auch histochemisch glykogenfrei, mit Ausnahme einiger besonderer, eng begrenzter Zellverbände (z.B. Area postrema), die bei einer quantitativen Analyse mit Sicherheit nicht ins Gewicht fallen.

Das Gesagte gilt aber nicht für alle Lebewesen. Das Nervensystem niederer Formen (Wirbellose, niedere Wirbeltiere) ist wesentlich reicher an Glykogen, was sowohl biochemisch (s. RICHARDS 1955) als auch histochemisch (SATO 1930, FRIEDE 1955, J. ARIËNS KAPPERS 1956, OKSCHE 1956/57, 1958) nachgewiesen werden konnte.

Dieses Gebiet ist vergleichend-biochemisch auf breiterer Basis noch nicht erschlossen.

Die Methodik des histochemischen Glykogennachweises ist in den letzten Jahren ganz wesentlich verbessert worden (vgl. SHIMIZU und KUMAMOTO 1952, PEARSE 1953, GRAUMANN 1958, 1959). Am Lebermaterial gleichzeitig durchgeführte biochemische und histochemische Untersuchungen haben erwiesen, daß der histochemische Glykogennachweis recht empfindlich ist und zu den zur Zeit sichersten histochemischen Methoden gerechnet werden kann (DEANE, NESBETT und HASTINGS 1946).

Es ist ein Ziel dieser Diskussion, die Aufmerksamkeit der Biochemie auf gewisse Funktionszustände zu lenken, unter denen auch im ZNS der Säuger große Mengen Glykogen gebildet werden. Der Glykogenaufbau und -abbau vollzieht sich bevorzugt an bestimmten Strukturelementen, die glöser Natur sind. Es besteht kein Zweifel, daß der rein stoffwechselmäßige Ablauf hier nur durch biochemische Analyse geklärt werden kann. Wenn auch die histochemische Arbeitsweise in der Zahl der durch sie erfaßbaren Stoffe und Reaktionen sehr begrenzt ist, erlaubt sie doch in den günstigsten Fällen, wo eine Phase des Stoffwechsels festgehalten wird, eine sehr differenzierte Lokalisation im ganzen Strukturgefüge. Dadurch ist es möglich, zytodynamische Beziehungen räumlich darzustellen. Dieser Vorzug darf nicht zu gering eingeschätzt werden.

In der allerletzten Zeit wurden Fortschritte im histochemischen Nachweis von Dehydrogenasen erzielt, die in Hinsicht auf die Ergebnisse dieser Arbeit interessante Ausblicke ermöglichen. Es stellte sich heraus, daß neue Tetrazol-Verbindungen am frischen Gewebsschnitt als Akzeptor von Elektronen besonders gut geeignet sind und eine scharfe Lokalisation der Farbstoffkörnchen in der Struktur gestatten (WOLFGRAM und ROSE 1959). Durch schnellste Bebrütung von gefrier-geschnittenen 15 μ dicken Hirnschnitten in den entsprechenden, gepufferten Substratlösungen, gelang hier erstmalig der Beweis, daß die Glia (Astrocyten, Oligodendrocyten, Hortega-Zellen) Bernstein-, Äpfel- und Milchsäure-, sowie α -Glycerophosphat-Dehydrogenasen enthält.

LOWRY (1955) wies in der weißen Substanz des ZNS mehr Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nach als in der grauen Substanz. Er vermutet hier einen Zusammenhang mit den Gliazellen, da die Oligodendrocyten in der weißen Substanz zahlreicher sind.

Diese Hinweise auf die Stoffwechselaktivität der Glia gaben den Anlaß, eine funktionelle Deutung der eigenen Befunde zu versuchen. Der Zweck dieses Vorhabens wäre schon dann erfüllt, wenn es gelänge, eine Arbeitshypothese aufzustellen, die in der Zukunft eine Zusammenarbeit der dynamischen Zytologie und der Biochemie ermöglicht.

Die Aufmerksamkeit soll dabei auf das Glykogen als Reservekohlenhydrat gelenkt werden, aus dem Glucose freigemacht werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt kann aus der Verfolgung des Glykogenaufbaus und -abbaus ein gewisser Einblick in den Kohlenhydratstoffwechsel der Zelle erhofft werden, der u. a. einen Hinweis auf den Energieumsatz der Zelle enthält.

„Das wesentliche Brennmateriale der Nervenzelle ist Kohlehydrat.“ „Das Gehirn ist reich an Hexokinase, kann also die Blutglucose rasch verwerten.“ (LEUTHARDT 1957). „At present it is well established that glucose is by far the predominant foodstuff of the brain“ (KETY 1955).

Die glykolytische Kohlenhydratspaltung im ZNS tritt wohl nur unter pathologischen Bedingungen, wie Sauerstoffmangel auf (LEUTHARDT 1957).

Im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der Gliazellen erscheinen noch die folgenden Befunde von Bedeutung. Nach ALLEN (1959) zeigen Astrocytome eine sehr niedrige Aktivität der Zytochromoxydase (vgl. POPE 1958). Ein Oligodendrocytom wies die 7fache Aktivität dieses Fermentes auf. (Dieser Befund wird von ALLEN zur Unterstreichung der Bedeutung der Oligodendrocyten für die Markscheidenbildung herangezogen.) ELLIOTT (1959) betont, daß in der Großhirnrinde der respiratorische Quotient ($Q O_2$) der Gliazellen nur etwa $\frac{1}{3}$ des Wertes für die Neurone beträgt (vgl. dazu auch POPE 1958, KOREY 1959, KOREY und ORCHEN 1959).

Zur Orientierung über die biochemischen Zusammenhänge dienten mir neben der „Physiologischen Chemie“ von LEUTHARDT (1959) die 1955 erschienenen Aufsätze von ELLIOTT, WEIL-MALHERBE, RACKER, SPERRY, NACHMANSOHN, GERARD, HOLMES u. TOWER und KETY, die 1952 veröffentlichten Beiträge von WEIL-MALHERBE und OPITZ, sowie die Aufsätze und Diskussionsbemerkungen in WINDLE (1958) und KOREY (1959).

In Hinsicht auf die eigenen Befunde muß zuerst eine Erklärung für die Glykogenzunahme im ZNS winterschlafender und dauernarkotisierter Tiere gesucht werden, die sowohl Glia- als auch Ganglienzellen betraf. Im Falle der Ganglienzellen sind folgende Ursachen denkbar:

1. Herabgesetzte physiologische Aktivität; die aus dem Blut stammende Glucose wird nicht mehr laufend in der Zelle verbraucht und für die Dauer der verminderten funktionellen Leistung als Glykogen gespeichert.

2. Alterierte Aktivität einiger wesentlicher Fermente des Kohlenhydratstoffwechsels.

Eine Verknüpfung beider Faktoren wäre denkbar. Die Durchblutung des Gehirns darf dabei nicht übersehen werden.

Schwieriger ist die Erklärung für die Glia. Sollte das in der Glia nachweisbare Glykogen als Folgeerscheinung einer herabgesetzten Glucoseverbrennung entstehen, dann würde das für eine stark gedrosselte funktionelle Aktivität der Gliazellen im Winterschlaf und in der Dauernarkose sprechen. Reine Stützaufgaben würden solche Mengenschwankungen eines paraplasmatischen Reservekohlenhydrates nicht erklären. Es erscheint von Interesse, daß ein leichter Grad der Anoxie, der die Neurone bereits schwer schädigt, auf die Astrocyten stimulierend wirkt und progressive Reaktionen auslöst (POPE 1958, ADAMS 1958).

Es könnte an eine winterschlafbedingte Herabsetzung der von HORSTMANN und MEVES (1959) erwogenen Aufgaben der Glia in der Kontrolle der ionalen Zusammensetzung der extrazellulären Flüssigkeit gedacht werden (vgl. HARTMANN 1959). Eine weitere Möglichkeit könnte aber darin gegeben sein, daß die Gliazelle in ihren Gefäßbeziehungen nur einen Durchgangsort des Glucosestromes darstellt, der eigentlich auf die Ganglienzellen ausgerichtet ist [vgl. den histochemischen Nachweis der alkalischen Phosphatase in den Endfüßen der Astrocyten (SHIMIZU 1950) und ependymalen Tancyten (OKSCHE 1958)]. Eine Diskussion über den intra- oder extrazellulären Glucosetransport s. in WINDLE (1958), S. 48—49, wobei PALAY einen extrazellulären Glucosestrom in den 200—300 Å weiten Spalträumen für unwahrscheinlich hält. Läge nun in den Ganglienzellen

eine funktionell bedingte Herabsetzung der Glucoseverbrennung vor, die von einer Glykogenbildung begleitet ist, so wäre eine Stauung des Glucosestromes auch in den Leitbahnen der Glia verständlich. Diese Erwägung wird diskutabel durch die Beobachtung, daß im ZNS inmitten einer glykogenarmen Umgebung gliöse Glykogenstraßen existieren, die eindeutig nur glykogenreichen Hirnkernen zugeordnet sind (OKSCHE 1958).

Sofern Gliazellen vom Charakter ependymaler Tancyten an der Bildung von Stoffstraßen beteiligt sind, die zu den Ganglienzellen führen, sei auf einen neuen Befund von BIRGE (1960) hingewiesen. Beim Hühnchen entstehen typische ependymale Gliocyten aus den ependymalen Stammzellen nur dann, wenn sich dieses Zellmaterial in Kontakt mit den Zellen der präsumptiven grauen Substanz („mantle tissue“) entwickeln kann. In Kontakt mit der Marginalzone des Neuralrohrs gehen aus dem Ependym unipolare und bipolare Spongioblasten hervor. In Verbindung mit dem Kopfmesenchym entstehen dagegen gewöhnliche zylindrische Epithelzellen. Dieser unterschiedliche Ablauf deutet darauf hin, daß der normale Differenzierungsvorgang der Ependymzellen in einer essentiellen Beziehung zur Entwicklung der nervösen Mantelzone steht (BIRGE). — Vermutlich werden dabei schon frühzeitig Funktionsgemeinschaften von Ganglien- und Gliazellen ausgeprägt (Verf.).

In diesem Zusammenhang muß auch die selektive Resorptionsfähigkeit der Ependym- und Gliazellen gewürdigt werden, der sehr wahrscheinlich eine wesentliche Bedeutung für den Stoffaustausch zwischen Liquor und Gehirn zukommt (FELDBERG und FLEISCHHAUER 1960). Hier sei auf die ausgeprägten Unterschiede in der Morphologie und in der Funktion der gliösen Strukturen der Ventrikelwände hingewiesen, die FLEISCHHAUER (1960a) festgestellt hat.

Winterschlaf. Eine Übersicht über die Aktivität des Nervensystems im Winterschlaf findet sich in den Monographien von HENSEL (1955) und EISENTRAUT (1956).

Die Hirnrinde zeigt im tiefen Winterschlaf (Ziesel, 5—7° C rektal) keine Spontanaktivität im Aktionsstrombild (KAYSER 1950). Dabei ist sie noch durchaus erregbar; wird das Tier gestört, oder kommt es zu einer Schwankung der Lufttemperatur, so können langsame Wellen mit großer Amplitude beobachtet werden (KAYSER). Bei 19—21° Gehirntemperatur beginnt das Erwachen, wobei die Spontanaktivität der Großhirnrinde in Erscheinung tritt (CHATFIELD u. a. 1951). Zwischen 20° und 25° C Rektaltemperatur beobachtete KAYSER im EEG eine Aktivitätssteigerung. Bei Annäherung an die Wachtemperatur (zwischen 25° und 30° rektal) traten keine weiteren Veränderungen in Erscheinung (Ziesel). Die Gehirntemperatur ist beim Erwachen wesentlich höher als die Rektaltemperatur (vgl. HENSEL 1955). Es wird in zukünftigen Untersuchungen notwendig sein, vor der Entnahme des Materials für histologische Untersuchungen auch die Gehirntemperatur zu bestimmen. Bei den Siebenschläfern und Igelu dieser Untersuchung lag ein deutlicher Zusammenhang des im ZNS nachgewiesenen Glykogens mit der Körpertemperatur vor. Bei der Erwärmung war das Erwachen der motorischen Aktivität, die nach KAYSER von einer entsprechenden Aktivität im EEG begleitet wird, durch einen langsam fortschreitenden Glykogenschwund gekennzeichnet. Beim Siebenschläfer hatte eine rege 10tägige motorische Aktivität (mit Fütterung) bei einer Rektaltemperatur von 34° noch keinen vollständigen Glykogenschwund im ZNS zur Folge. Um hier alle Zusammenhänge zu klären, müßten physiologische, biochemische und histochemische Untersuchungen an dem gleichen Objekt durchgeführt werden.

Der Zusammenhang der Glykogenmenge mit der nervösen Aktivität ergibt sich auch aus der Beobachtung, daß bei dem aufgewachten, 10 Tage lang motorisch

aktiven Siebenschläfer die Großhirnrinde noch wesentlich mehr Glykogen enthielt als die Medulla oblongata. Beim Erwachen aus dem Winterschlaf beginnt nach CHATFIELD und LYMAN (1954) die Aktivität des Hirnstammes früher als die Tätigkeit des Cortex.

Über chemische Veränderungen am Nervensystem winterschlafender Säuger liegen nur wenige Angaben vor (vgl. HENSEL 1955, EISENTRAUT 1956), die im Zusammenhang mit den hier erörterten Fragen nicht weiter führen.

Histologisch waren im Winterschläferhirn glykogenreiche Gliazellen räumlich stets solchen Nervenzellansammlungen zugeordnet, die viel Glykogen angehäuft hatten. Durch Glykogenreichtum zeichneten sich ganz besonders die Gefäßendfüße der Astrocyten aus. Wesentlich erscheint der Glykogenbefund im Bereich der nur elektronenmikroskopisch sichtbaren feinsten Fortsätze der Ganglien- und Gliazellen, die voneinander nur durch etwa 200 Å weite Zwischenräume getrennt sind.

Megaphenschlaf und Äthernarkose. Der grundlegende Unterschied zwischen dem physiologischen Winterschlaf (Siebenschläfer und Igel) einerseits und dem Megaphenschlaf und der Äthernarkose (Ratte) andererseits bestand darin, daß in dem pharmakologischen Schlaf nur das Perikaryon der Ganglienzellen, nicht aber der Gliazellen Glykogen aufwies. Aber auch in den Ganglienzellen wurde die für den physiologischen Winterschlaf charakteristische Glykogenfülle nicht erreicht. Vor allen Dingen blieb der lichtmikroskopisch homogen erscheinende Bereich glykogenfrei. An der Membr. limit. gliae perivasc. trat kein Glykogensaum in Erscheinung. Im Gegensatz zu den großzelligen Kerngebieten der Medulla oblongata wies die Großhirnrinde auch nach mehrtägigem Megaphenschlaf kein Glykogen auf. Da im Megaphenschlaf eine Dämpfung der Aktivität der Großhirnrinde vorliegen soll, ist dieser Befund überraschend. Auch in der Medulla betraf die im Megaphenschlaf beobachtete Glykogenanreicherung nur eine Reihe von großzelligen Medulla-Kernen, zum größten Teil Hirnnervenkernen, dagegen nicht das Geflecht der *Formatio reticularis grisea*, in dem aber im Winterschlaf ebenfalls Glykogen vorkam. Sofern es im pharmakologischen Schlafzustand zur Glykogenbildung gekommen war, bestand eine Beziehung zwischen dem Grad der Senkung der Körpertemperatur und der histochemisch nachweisbaren Glykogenmenge.

Weshalb in der Narkose die gliösen Strukturen sich nur selten und dann auch nur mäßig stark mit Glykogen füllten, kann vorläufig nicht gedeutet werden. Wenn die mit Aktivitätsherabsetzung verbundene Einschränkung der Glucoseverbrennung das Primäre der Glykogenanreicherung darstellt, dann wäre die Glykogenbildung zuerst in den Trägern der nervösen Aktivität zu erwarten und erst dann in den zuführenden Elementen. Zu berücksichtigen ist auch die im Vergleich zum Winterschlaf geringere Dauer des Megaphenschlafes und das Fehlen der endokrinen Faktoren, die im physiologischen Winterschlaf sehr wahrscheinlich mitspielen. Damit wird aber nichts über den kausalen Unterschied ausgesagt, der in der verschiedenen physiologischen und chemischen Aktivität der Zelle liegen muß. Ein Unterschied könnte auch an der Blut-Hirn-Schranke gegeben sein, an der die Endfüße der Astrocyten beteiligt sind. Das Problem der Blut-Hirn-Schranke kann hier nicht eingehend diskutiert werden (Literatur s. SPATZ 1933, WISLOCKI und LEDUC 1952a, DEMPSEY und WISLOCKI 1955, HOLMES und TOWER

1955, BAKAY 1956, 1957, QUADBECK und HELMCHEN 1957, TSCHIRGI 1958). Man muß auch an eine grundsätzliche Verschiedenheit des Stoffwechsels denken. Da die Ratte kein Winterschläfer ist, kann die mit pharmakologischen Mitteln erzielte Temperatursenkung bei ihr ganz andere Folgen haben als bei den echten Winterschläfern, die mit besonderen Mechanismen der Temperaturregelung ausgestattet sind. Hier kann als Beispiel das unterschiedliche Verhalten des Atemzentrums angeführt werden. Winterschläfer atmen noch bei 4° Rektaltemperatur, wogegen bei der Ratte die Atemlähmung bereits bei 15° rektal eintritt (vgl. HENSEL 1955).

In der allerletzten Zeit konnte auch mit biochemischen Methoden (SVORAD 1959) gezeigt werden, daß bei Senkung der Körpertemperatur (Ratte, auf 18,3° rektal durch Eiskühlung) das Gehirnglykogen erhöht wird und zwar regional unterschiedlich. Herabsetzung der Körpertemperatur wirkt auf die Synthese des Gehirnglykogens nicht hindernd. SVORAD schloß daraus, daß einige funktionelle Zustände des Gehirns ihr metabolisches Korrelat in Konzentrationsänderungen des Gehirnglykogens haben.

In eigenen Versuchen lag eine Senkung der Körpertemperatur sowohl im Winterschlaf, als auch im Megaphenschlaf vor. Im Winterschlaf war sie stärker, was die im Vergleich zum Narkoseexperiment größere Glykogenmenge erklären könnte. Sehr wahrscheinlich ist aber die Körpertemperatur nicht der einzige Faktor, der hier im Spiel ist.

Biochemisch sind einige Veränderungen bekannt, die den Kohlenhydratstoffwechsel in der Narkose betreffen. QUASTEL (1955) weist darauf hin, daß Narkotica die Oxydation von Glucose, Lactat und Pyruvat beeinflussen. Die Empfindlichkeit des Oxydationsvorganges muß einen wesentlichen Faktor im Narkosemechanismus darstellen. Die Glucosehydrogenase selbst ist relativ narkoseunempfindlich; beeinflusst wird nach MICHAELIS und QUASTEL (1941) ein Faktor, der zwischen der Dehydrogenase und der Zytochromoxydase eingeschaltet ist, vermutlich ein Flavoprotein (GREIG 1946). Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen dem physiologischen Winterschlaf und Äthernarkose bzw. Megaphenschlaf konnte in eigenen Untersuchungen am Glykogenvorrat der Leber beobachtet werden. Während die Winterschläferleber im histochemischen Präparat auffallend glykogenreich ist, liegt im Narkose-schlaf eine vollkommen glykogenfreie Leber vor.

Nach der Beschaffenheit der elektronenmikroskopischen Feinstruktur und der histotopochemischen Glykogenverteilung erscheint es unwahrscheinlich, daß der Glucosestrom in vivo die Hirnsubstanz so gleichmäßig durchsetzt, wie man es nach den Ergebnissen, die in vitro-Versuchen gewonnen wurden, annimmt. GEIGER, MAGNES, TAYLOR und WAELSCH (1949) haben am Katzenhirn gezeigt, daß die Glucose-Penetration keinen einfachen Vorgang darstellt. Dieser kommt in vitro mit der Zeit zum Stillstand, was mit einem Erlöschen der physiologischen Aktivität im anatomischen Präparat verbunden ist. Dagegen bleibt die elektrophysiologische Aktivität des Katzen-Cortex bei Mikroperfusion in situ für Stunden unverändert, auch dann, wenn Glucose aus der Perfusionsflüssigkeit weggelassen wird (GRENNELL und DAVIES 1950). GEIGER, MAGNES, TAYLOR und VERALLI (1954) sind der Meinung, daß die Glucoseaufnahme durch das Gehirn ein aktiver Prozeß ist, der von verschiedenen „Aktivatoren“ abhängt, die unter normalen Bedingungen im strömenden Blut vorkommen. Nach der Meinung GERARDS (1955) gibt es aber hier in den kritischen Punkten noch keine definitive Antwort. TSCHIRGI (1958) rät zu untersuchen, ob die Astrocyten nicht die „metabolic machinery and the functional capacity to regulate solute transfer“ enthalten.

Dieser aktive Transportmechanismus käme sowohl für organische Moleküle als auch für anorganische Elektrolyte in Frage.

Es müßte eingehend geprüft werden, ob nicht die Intaktheit des nur elektronenmikroskopisch erfaßbaren Fortsatzgefüges einen wesentlichen Faktor in dem unterschiedlichen Verhalten von Gehirngewebe *in vivo* und *in vitro* darstellt.

In allen Fällen, wo das Strukturgefüge des ZNS operativ unterbrochen war, fand sich in dem überlebenden Gewebe des Wundrandes sehr viel Glykogen. Die Glykogenneubildung lag vornehmlich in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich vor. Im Wundrand waren nur prall mit Glykogen gefüllte Astrocyten zu erkennen, aber keine glykogenhaltigen Ganglienzellen. Man könnte geneigt sein, die Glykogenbildung in den Astrocyten einfach mit einer retrograden Schädigung zu erklären, die sich in einer Alteration des Stoffwechsels äußert. Weshalb sind aber dann nicht gleichzeitig auch die Ganglienzellen betroffen, deren feinste Ausläufer ebenfalls in großer Anzahl durchtrennt wurden? Es läge nahe anzunehmen, daß die Ganglienzelle gegen solche traumatischen Schädigungen wesentlich empfindlicher ist als die Glia.

Das Verhalten der glösen Elemente nach einer Verletzung ist am leichtesten beim Frosch zu studieren, wo der Fortsatz der ependymalen Tanycyten durch den Einstich relativ leicht unterbrochen werden kann. In dem Zeitraum von 8 Tagen bis 4 Wochen nach dem Eingriff tritt in den durchtrennten Tanycytenfortsätzen eine sehr starke Auftreibung des proximalen Stumpfes in Erscheinung, die eine pralle Füllung mit Glykogen aufweist. Das jenseits des Stichkanals liegende Areal ist dagegen vollständig glykogenfrei, was auffällig ist, da im ZNS der Anuren auch unter normalen Bedingungen beträchtliche Glykogenmengen nachgewiesen werden können. Die gesteigerte Glykogenbildung im proximalen Stumpf und im Perikaryon der Froschtanycyten muß nicht unbedingt auf eine grundlegende Alterierung des Zellstoffwechsels (Schädigung, Degeneration) hinweisen.

Eine Stoffakkumulation wird auch im proximalen Stumpf durchtrennter Axone beobachtet. Sie ist in den operativ unterbrochenen Axonen neurosekretorischer Ganglienzellen besonders deutlich. Dieses Phänomen wird entweder als eine Stauung gedeutet, die auf die Blockade eines intracellulären, peripherwärts gerichteten Stoffstromes folgt (HILD 1951, 1954, BARGMANN 1954, E. und B. SCHARER 1954) oder als eine lokale Synthesesteigerung aufgefaßt (s. CHRIST, ENGELHARDT und DIEPEN 1958).

Einige Tage nach einer Farbstoffinjektion in das Ventrikellumen von Hai (HORSTMANN 1954) und Frosch (J. ARIËNS KAPPERS 1956) treten Farbstoffgranula in den ventrikelfernen Abschnitten der Tanycytenfortsätze auf. Die Astrocyten können sehr wahrscheinlich nicht nur Stoffe aus der Blutbahn resorbieren, sondern spielen neben den Ependymzellen auch bei der selektiven Stoffresorption aus dem Liquor eine wesentliche Rolle (FLEISCHHAUER 1960a). Die Glia zeichnet sich sowohl durch sekretorische (OKSCHE 1959/60) als auch durch resorptive Leistungen aus, die regional unterschiedlich ausgeprägt sind (FLEISCHHAUER 1960).

Das wechselhafte Verhalten des Glykogenvorrats im Plexus chorioideus und im Ependym (vgl. OKSCHE 1958) läßt in seiner topischen und zeitlichen Gesetzmäßigkeit daran denken, daß bei niederen Wirbeltieren ein glucosehaltiger Stoffstrom von der freien Ventrikeloberfläche ins Innere des Gehirns gerichtet ist. Da der extrazelluläre Raum¹ nach HORSTMANN und MEVES (1959) nur etwa 5—7% beträgt, ist es nicht denkbar, daß ein wesentlicher Stoffstrom vornehmlich in den höchstens 200 Å breiten Zwischenräumen vor sich gehen könnte. Die Aufmerksamkeit wird also auf die Fortsätze der Zellen gelenkt. Es wäre

¹ Im Rindengrau als prozentualer Anteil am Gesamtvolumen ausgedrückt.

denkbar, daß, wenn die Glucose nicht mehr in das Gebiet der feinsten Verzweigungen eingeschleust werden kann, um an Ganglienzellen weitergegeben zu werden, die operativ unterbrochenen Tanycyten aus der angestauten Glucose Glykogen aufbauen.

Viel schwieriger ist die Deutung dieser Hypothese für das Säugerhirn. Dort liegen die Verhältnisse insofern anders, als der glucosereiche Stoffstrom nur aus den Blutgefäßen und nicht aus dem glucosearmen Ventrikelliquor stammen kann. Die Astrocyten sind so auf den stark verzweigten Gefäßbaum ausgerichtet, daß es operativ nicht möglich ist, nur eine bestimmte Verlaufsrichtung der Fortsätze zu treffen. Bei der Ratte enthält der Wundrand nur bis zum 4. Tag nach dem Eingriff Glykogen (vgl. HESS 1955). Eine Normalisierung des versorgenden Saftstromes wäre im Säugerhirn leichter denkbar, da in das submikroskopische Fortsatzgeflecht die Ausläufer sehr vieler Zellen entsandt werden, die z.T. von Zellen stammen, die weit entlegen sind. Alle diese Astrocyten verzweigen sich schon in der Nähe des Zellkernes, so daß im Geflecht bald eine Durchmischung der von den verschiedensten Zellen stammenden Strukturelemente stattfindet. Die Ependymfortsätze der *Rana temporaria* teilen sich dagegen dichotomisch weit an der Peripherie. Ein parallel zur Ventrikel- und Hirnoberfläche gesetzter Einstich unterbricht beim Frosch eine ganze Reihe von noch ungeteilten Fortsätzen, so daß ein keilförmiges, sich in peripherer Richtung verbreiterndes Feld von der Versorgung ganz ausgespart bleibt.

Dieser Deutung soll aber gleich Kritik entgegengehalten werden. Ist es nicht möglich, daß die Glykogenbildung etwas mit dem Ablauf von Regenerationsvorgängen zu tun hat? In diesem Zusammenhang läßt sich ein anderes Gewebe — das Epithel der Haut — zum Vergleich heranziehen, das ebenfalls unter gewissen Funktionsbedingungen Glykogen enthalten kann. Eine eingehende Zusammenstellung der Literatur ist bei HORSTMANN (1957b) zu finden. In der Epidermis steigt die Glykogenmenge bei der Regeneration nach Schädigungen (FIRKET 1951a, b) an. In den Epithelzellen der Haut scheint das Glykogen ein Energiedepot für verschiedene Aufgaben darzustellen: 1. Für den Zellteilungsvorgang, 2. für Differenzierungsvorgänge (vgl. JANOSKY und WENGER 1956), 3. für den Verhornungsprozeß.

Da bei der Narbenbildung im ZNS die proliferativen Vorgänge ausschließlich an der Glia ablaufen, wäre für die im Wundrand nachgewiesenen glykogenhaltigen Gliazellen auch eine ähnliche Erklärung denkbar, wie für das regenerierende Epithel.

Im menschlichen Gehirn lag in der Tumorrundzone ein im Prinzip ähnliches Verhalten der Astrocyten vor wie bei der Ratte im Randgebiet der Stichwunde. Auch hier wurde eine proliferative Formentwicklung der Astrocyten festgestellt. In diesem Fall kann aber der zunehmende Glykogenreichtum nicht durch regenerative Vorgänge erklärt werden. Versucht man hier die Anwendung der Hypothese über den blockierten Glucosestrom, so wäre die Behinderung in der Kompression zu suchen, die durch den vordringenden Tumor verursacht wird. Vorläufig kann man aber hier noch nicht sicher erkennen, wo die Ursache und wo die Wirkungen liegen. Bei der Beurteilung der Tumorrundzone müssen die Ergebnisse FRIEDES (1957) berücksichtigt werden. In den Fällen, wo im exziierten

Randzonenmaterial Glykogen vorlag, wurde im EEG eine Frequenzverlangsamung des Grundrhythmus festgestellt. Erwähnenswert erscheint außerdem, daß Gliatumoren einen niedrigen respiratorischen Quotienten zeigen (POPE, HESS und ALLEN 1957, POPE 1958). Die Untersuchungen am menschlichen Material müssen mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln der histologischen Forschung fortgesetzt werden.

Auch wenn man von der Hypothese des blockierten Glucosestroms ganz absieht, hat die vorliegende histochemische Studie neue Beweise dafür geliefert, daß die Astrocyten und die ependymalen Tancycyten einen von der Funktion abhängigen Kohlenhydratstoffwechsel haben. Die von NIESSING u. a. experimentell-morphologisch erforschten funktionellen Beziehungen der Glia sowohl zu den Gefäßen als auch zu den Ganglienzellen werden durch die vorliegenden Befunde ergänzt und die Annahme gestützt, daß die wesentliche Stoffwechselaufgabe der Gliazellen in der Versorgung der Ganglienzelle liegt.

Es ist bemerkenswert, daß die glykogenhaltigen Astrocytenformen, die im Winterschlaf und im Randgebiet von Hirnwunden und -tumoren beobachtet wurden, weitgehend an die glykogenbeladenen Astrocyten bei der Glykogenspeicherkrankheit erinnern. Im Gegensatz zu den vier bisher erforschten Typen der Glykogenspeicherkrankheit (vgl. CORI 1957), von denen bei dreien eine Enzymstörung (s. S. 344) aufgedeckt werden konnte, sind die biochemischen Grundlagen der Glykogenbildung im Versuchs- und Operationsmaterial dieser Studie nicht bekannt. Die histologisch festgestellte Übereinstimmung im Glykogengehalt der Astrocyten könnte auch auf verschiedenen Wegen entstanden sein.

Eine Lösung des Problems ist nur bei gleichzeitiger Anwendung physiologischer, biochemischer und histochemischer Methoden zu erwarten. Zytochemisch wären in Zukunft neben dem Glykogennachweis auch noch alle die Reaktionen anzuwenden, die einen Aufschluß über den Kohlenhydratstoffwechsel gestatten. Der Weg des Glucosestromes könnte in den Strukturen des ZNS nach intraarterieller und intraventrikulärer Zufuhr von Glucose, die mit C^{14} markiert ist, autoradiographisch dargestellt werden. Dieser Versuch ließe sich mit einer operativen Leitstrukturunterbrechung kombinieren. Eine weitere Vervollkommnung der morphologischen Befunde ist aus der elektronenmikroskopischen Strukturanalyse zu erwarten. Diese müßte sowohl qualitativer, als auch quantitativer Art sein, so daß das aus den Meßergebnissen Kalkulierte zu den Ergebnissen der physiologischen Forschung in Beziehung gesetzt werden kann.

Zusammenfassung

1. In Fortführung einer früheren Studie (OKSCHE 1958) wurden 40 Gehirne von *Rana temporaria* L., *Erinaceus europaeus* L., *Glis glis* (L.) und *Rattus rattus*, sowie operativ exzidiertes Material aus zwei menschlichen Gehirnen mit histochemischen Glykogennachweismethoden untersucht.

2. Es wurde beobachtet, daß in ependymalen Gliazellen (Tancycyten) und Astrocyten ein Glykogenaufbau und -abbau vor sich geht, der mit dem physiologischen Aktivitätszustand des ZNS zusammenhängt. Solche Ependym- und Gliazellen sind räumlich Ganglienzellen zugeordnet, die sich ebenfalls durch Glykogenaufbau- und -abbau auszeichnen. Die zeitliche Folge und die topische Lokalisation dieser Glykogenbildung sind so, daß man vermuten kann, daß die

ependymalen Tanycyten der niederen Wirbeltiere und Astrocyten an der Versorgung der Ganglienzelle mit Glucose wesentlich beteiligt sind. Die elektronenmikroskopische Feinstruktur des ZNS besagt, daß ein nicht gerichteter Diffusionsstrom von den Blutgefäßen bzw. vom Liquor zur Ganglienzelle kaum denkbar ist.

3. Die feinsten Ausläufer der Astrocyten und der ependymalen Tanycyten sind mit den terminalen Zellfortsätzen der Ganglienzellen in dem lichtmikroskopisch nicht mehr auflösbaren Bereich des ZNS zu einem fast lückenlosen dreidimensionalen Gefüge verflochten. Histochemisch findet man auch in diesem Strukturbereich Glykogen.

4. Da die Glykogenbildung nur bei niederen Wirbeltieren das ganze ZNS erfaßt, bei Säugern dagegen auf bestimmte Kerngebiete beschränkt bleibt, ist es verständlich, daß bei der biochemischen quantitativen Analyse größerer Areale des Säugergehirns diese lokale Glykogenanreicherung kaum in Erscheinung tritt.

5. Zu einer eindrucksvollen Glykogenbildung in den Gliazellen kommt es in der Winterstarre (Frosch), im Winterschlaf (Siebenschläfer, Igel) und in einem mehrtägigen pharmakologischen Schlafzustand (Ratte), der experimentell durch Megaphen erzielt wurde. Die histochemisch nachgewiesenen Glykogenmengen zeigten eine deutliche Beziehung zur Körpertemperatur, Schlaftiefe und Schlafdauer.

6. Das histologische Glykogenbild im Megaphenschlaf unterschied sich von dem Zustand im physiologischen Winterschlaf dadurch, daß nur im Winterschlaf eine starke Glykogenbildung auch in dem feinsten elektronenmikroskopischen Strukturbereich vorlag.

7. In der topischen Glykogenverteilung zeigten sich gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Hirnabschnitten. So wurde im tiefen Winterschlaf ein der Gefäßwand anliegender Glykogensaum im Großhirn (sowohl in der weißen, als auch in der grauen Substanz) beobachtet, dagegen nicht in der Medulla oblongata und im Rückenmark.

8. Nach dem Erwachen aus dem Winterschlaf (Siebenschläfer) schwand das Glykogen zuerst aus dem Rückenmark und der Medulla oblongata und erst dann aus der Großhirnrinde.

9. Wird das nur elektronenmikroskopisch erfaßbare Strukturgefüge der feinsten Ganglien- und Gliazellenausläufer durch gezielte Stichverletzung (Frosch, Ratte) zerstört, so wird in den ependymalen Tanycyten (Frosch) und Astrocyten (Ratte) des Wundrandes viel Glykogen gebildet, das nur an gliöse Strukturen gebunden ist. In operativ unterbrochenen Zellausläufern der Froschtanycyten kommt es dabei zu einer extrem starken Glykogeneinlagerung in dem stark aufgetriebenen proximalen Stumpf.

10. Auch beim Menschen kommt es im Randgebiet von Hirntumoren zu einer starken Glykogenanhäufung in den Astrocyten. Sie ist um so eindrucksvoller, je stärker die Astrocyten proliferiert sind. Der morphologische Wandel, der in der Formenreihe der progressiven Astrocytenreaktion sichtbar wird, geht offensichtlich mit entsprechenden Veränderungen im Zellstoffwechsel einher. Bemerkenswert ist, daß auch bei einigen Formen der Glykogenspeicherkrankheit, die sich durch eine Glykogenablagerung im ZNS auszeichnen, zahlreiche stark proliferierte, mit Glykogen überladene Astrocyten vorkommen.

11. Es wurde diskutiert, ob die an Gliazellen gebundene Glykogenbildung am Wundrand nicht einen Hinweis auf die Stauung eines glucosereichen Stoffstromes an der Unterbrechungsstelle der Strukturen enthält.

Literatur

- ADAMS, R. D.: Implications of the biology of the neuroglia and microglia cells for clinical neuropathology, p. 245—263. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- ALLEN, N.: Diskussionsbemerkung, S. 258. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- BAIRATI, A.: Perivascular relationship of the neuroglia cells, p. 85—98. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- BAKAY, L.: The blood-brain barrier. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1956.
- Dynamic aspects of the blood-brain barrier. In D. RICHTER, *Metabolism of the Nervous System*. London-Paris-New York-Los Angeles: Pergamon-Press 1957.
- BARGMANN, W.: *Das Zwischenhirn-Hypophysensystem*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1954.
- BAUER, K. FR.: *Organisation des Nervengewebes und Neurencytiumtheorie*. München u. Berlin: Urban & Schwarzenberg 1953.
- BIELSCHOWSKY, M.: Allgemeine Histologie und Histopathologie des Nervensystems. In *Handbuch der Neurologie*, Bd. 1, Allgemeine Neurologie. I. Anatomie. Berlin: Springer 1935.
- BIRGE, W. J.: Tissue interactions associated with the differentiation of ependymal stem cells. *Anat. Rec.* **137**, 340 (1960).
- CAMMERMEYER, J.: Diskussionsbemerkung, S. 61. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- CANTI, R. G., J. O. W. BLAND and D. S. RUSSELL: Tissue culture of gliomata. *Cinematographic demonstration*. *Ass. Res. nerv. ment. Dis.* **16**, 1—24 (1935).
- CASAMAJOR, L.: Zur Histochemie der Ganglienzelle der menschlichen Hirnrinde. *Arb. neurol. Inst. Univ. Wien* **18**, 101—110 (1909).
- CHANG, J. J., and W. HILD: Contractile responses to electrical stimulation of glial cells from the mammalian central nervous system cultivated in vitro. *J. cell. comp. Physiol.* **53**, 139—144 (1959).
- CHATFIELD, P. O., and C. P. LYMAN: Subcortical electrical activity in the golden hamster during arousal from hibernation. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* **6**, 403—407 (1954).
- and D. P. PURPURA: The effects of temperature on the spontaneous and induced electrical activity in the cerebral cortex of the golden hamster. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* **3**, 225—230 (1951).
- CHRIST, J., FR. ENGELHARDT u. R. DIEPEN: Über Begleiterscheinungen der Neurosekretion im Silberbild. 2. Internat. Symposium über Neurosekretion, Lund, 1957, S. 30—41. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- CORI, G. T.: Glycogen structure and enzyme deficiencies in glycogen storage disease. *Harvey Lect.* **48**, 145 (1952).
- Biochemical aspects of glycogen deposition disease. *Mod. Probl. Pädiat.* **3**, 344—358 (1957).
- , and C. F. CORI: Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J. biol. Chem.* **199**, 661—667 (1952).
- DEANE, H. W., F. B. NESBETT and A. B. HASTINGS: Improved fixation for histological demonstration of glycogen and comparison with chemical determination in liver. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **63**, 401—406 (1946).
- DEMPSEY, E. W., and S. LUSE: Fine structure of the neuropil in relation to neuroglia cells, p. 99—108. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- , and G. B. WISLOCKI: An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat employing silver nitrate as a vital stain. *J. biophys. biochem. Cytol.* **1**, 245—256 (1955).
- DISCHE, Z., W. FLEISCHMANN u. E. TREVANI: Zur Frage des Zusammenhanges zwischen Winterschlaf und Hypoglykämie. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **227**, 235—238 (1931).
- EISENTRAUT, M.: *Der Winterschlaf mit seinen ökologischen und physiologischen Begleiterscheinungen*. Jena: Gustav Fischer 1956.

- ELLIOTT, K. A. C.: Brain tissue respiration and glycolysis, p. 53—93. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and J. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955. Diskussionsbemerkung, S. 230. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- Diskussionsbemerkung, S. 253. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV, New York: Hoeber 1959.
- Observations on glial metabolism: Water and electrolyte distribution, p. 230—236. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- FARQUHAR, M. G., and J. F. HARTMANN: Neuroglial structure and relationships as revealed by electron microscopy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **26**, 18—39 (1957).
- FELDBERG, W., and K. FLEISCHHAUER: Penetration of bromophenol blue from perfused cerebral ventricles into the brain tissue. *J. Physiol. (Lond.)* **150**, 451—462 (1960).
- FIRKET, H.: Etude histologique de la peau de cobaye lésée par la neige carbonique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **144**, 1715—1718 (1950).
- Recherches sur la régénération de la peau de mammifère. I. Introduction et étude histologique (évolution générale et analyse quantitative). *Arch. Biol. (Liège)* **62**, 309—334 (1951 a). II. Etude histochemique. *Arch. Biol. (Liège)* **62**, 335—351 (1951 b).
- FLEISCHHAUER, K.: Zur Chemoarchitektonik der Ammonsformation. *Nervenarzt* **30**, 305 bis 309 (1959).
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an der Faser glia. I. Beobachtungen an den Wandungen der Hirnventrikel der Katze (Seitenventrikel, III. Ventrikel). *Z. Zellforsch.* **51**, 467—496 (1960 a).
- Neuroglia. *Dtsch. med. Wschr.* **1960 b**, 2031—2035.
- FRIEDE, R. Der Kohlenhydratgehalt der Glia von *Hirudo* bei verschiedenen Funktionszuständen. *Z. Zellforsch.* **41**, 509—520 (1955).
- Unterschiedliche histochemische Kohlenhydratbefunde bei Biopsien von menschlichen Cortex des Großhirns und Kleinhirns. *Nervenarzt* **28**, 225—228 (1957).
- GEIGER, A., J. MAGNES, R. M. TAYLOR and M. VERALLI: Effect of blood constituents on uptake of glucose and on metabolic rate of the brain in perfusion experiments. *Amer. J. Physiol.* **177**, 138—149 (1954).
- — — and H. WAELSCH: Utilization of fructose by the perfused brain of the living cat. *Fed. Proc.* **8**, 54—55 (1949).
- GERARD, R. W.: Metabolism and function in the nervous system, p. 458—484. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- GLEES, P.: *Neuroglia. Morphology and function*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- The biology of the neuroglia: a summary, p. 234—242. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- GRAUMANN, W.: Zur Standardisierung des Schiffschens Reagens. *Z. wiss. Mikr.* **61**, 225—226 (1953).
- Untersuchungen zum cytochemischen Glykogennachweis. 1. Mitt.: Chemische Fixation auf Alkoholbasis. *Acta histochem. (Jena)* **4**, 29—40 (1957).
- Untersuchungen zum cytochemischen Glykogennachweis. 2. Mitt.: Chemische Fixation auf Pikrinsäurebasis. *Histochemie* **1**, 97—108 (1958).
- , u. W. CLAUS: Untersuchungen zum cytochemischen Glykogennachweis. 3. Mitt.: Versuche zum Diastasetest. *Histochemie* **1**, 241—246 (1959).
- GREIG, M. E.: The site of action of narcotics on brain metabolism. *J. pharmacol. exp. Ther.* **87**, 185—192 (1946).
- GRENELL, R. G., and P. W. DAVIES: Respiration of cerebral cortex in vivo, in the absence of glucose. *Fed. Proc.* **9**, 52 (1950).
- HAGER, H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der sogenannten Grundsubstanz in der Groß- und Kleinhirnrinde des Säugetieres. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **198**, 574—600 (1959).
- HALLERVORDEN, J.: Hirnerschütterung und Thixotropie. *Zbl. Neurochir.* **6**, 37 (1941).
- , u. G. QUADBECK: Die Hirnerschütterung und ihre Wirkung auf das Gehirn. *Dtsch. med. Wschr.* **82**, 129—134 (1957).

- HARTMANN, J. F.: The views concerning criteria for identification of neuroglia cell types by electron microscopy, p. 50—56. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- Diskussionsbemerkung, S. 255—256. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV, New York: Hoeber 1959.
- HAUK, R., B. ILLINGWORTH, D. H. BROWN and C. F. CORI: Enzymes of glycogen synthesis in glycogen-deposition disease. *Biochem. biophys. Acta* **33**, 554—556 (1959).
- HENSEL, H.: Mensch und warmblütige Tiere, S. 329—466. In H. PRECHT, J. CHRISTOPHERSEN u. H. HENSEL, *Temperatur und Leben*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- HESS, A.: Blood-brain barrier and ground substance of central nervous system. Effect of brain wounds. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) **74**, 149—157 (1955).
- HILD, W.: Experimentell-morphologische Untersuchungen über das Verhalten der „neurosekretorischen Bahn“ nach Hypophysenstieldurchtrennung, Eingriffen in den Wasserhaushalt und Belastung der Osmoregulation. *Virchows Arch. path. Anat.* **319**, 526—546 (1951).
- Das morphologische, kinetische und endokrinologische Verhalten von hypothalamischem und neurohypophysärem Gewebe in vitro. *Z. Zellforsch.* **40**, 257—312 (1954a).
- Histological and endocrinological observations in tissue cultures of posterior pituitary of dog and rat. *Tex. Rep. Biol. Med.* **12**, 474—488 (1954b).
- Myelogenesis in cultures of mammalian central nervous tissue. *Z. Zellforsch.* **46**, 71—95 (1957a).
- Ependymal cells in tissue culture. *Z. Zellforsch.* **46**, 259—271 (1957b).
- Observations on neurons and neuroglia from the area of the mesencephalic fifth nucleus of the cat in vitro. *Z. Zellforsch.* **47**, 127—146 (1957c).
- Myelin formation in cultures of mammalian central nervous tissue, p. 188—200. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- , J. J. CHANG and I. TASAKI: Electrical responses of astrocytic glia from the mammalian central nervous system cultivated in vitro. *Experientia* (Basel) **14**, 220—221 (1958).
- HOLMES, J. H., and D. B. TOWER: Intracranial fluids, p. 262—293. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- HORSTMANN, E.: Die Faserglia des Selachiergehirns. *Z. Zellforsch.* **39**, 588—617 (1954).
- Die Struktur der molekularen Schichten im Gehirn der Wirbeltiere. *Naturwissenschaften* **44**, 448 (1957a).
- Die Haut. Im Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Erg. zu Bd. III/1. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957b.
- Zur Frage des extracellulären Raumes im Zentralnervensystem. *Verh. anat. Ges. (Frankfurt/Main)*, 1958) **55**, 100—106 (1959).
- , u. H. MEVES: Die Feinstruktur des molekularen Rindengraues und ihre physiologische Bedeutung. *Z. Zellforsch.* **49**, 569—604 (1959).
- HORTEGA, P. DEL RIO: Microglia, p. 483—534. In W. PENFIELD, *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*, vol. II. New York: Hoeber 1932.
- ILLINGWORTH, B., and G. T. CORI: Structure of glycogens and amylopectins. III. Normal and abnormal human glycogen. *J. biol. Chem.* **199**, 653—660 (1952).
- — and C. F. CORI: Amylo-1,6-glucosidase in muscle tissue in generalized glycogen storage disease. *J. biol. Chem.* **218**, 123—129 (1956).
- , J. LARNER and G. T. CORI: Structure of glycogens and amylopectins. I. Enzymatic determination of chain length. *J. biol. Chem.* **199**, 631—640 (1952).
- JACOB, H.: Über diffuse Markdestruktion im Gefolge eines Hirnödems. (Diffuse Oedemnekrose des Hemisphärenmarkes.) *Z. ges. Neurol. Psychiat.* **168**, 382—395 (1940).
- JANOSKY, J. D., and B. S. WENGER: A histochemical study of glycogen distribution in the developing nervous system of *Amblystoma*. *J. comp. Neurol.* **105**, 127—150 (1956).
- KAPPERS, ARIËNS, J.: On the presence of periodic acid SCHIFF positive substances in the paraphysis cerebri, the choroid plexuses and the neuroglia of *Amblystoma mexicanum*. *Experientia* (Basel) **12**, 187—188 (1956).
- KAYSER, CH.: La léthargie hibernale des mammifères et le mécanisme de sa genèse. *Mammalia* **14**, 105—125 (1950).

- KETY, S. S.: Blood flow and metabolism of the human brain in health and disease, p. 294—310. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- KOENIG, H.: A radioisotopic study of nucleic acid and protein turnover in white matter of the mammalian neural axis, p. 241—251. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- KOREY, S. R.: Concentration of neuroglia cells, p. 203—210. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- Diskussionsbemerkung, S. 48—49. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- The Biology of Myelin. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- Diskussionsbemerkung, S. 252—253. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- , and M. ORCHEN: Relative respiration of neuronal and glial cells. *J. Neurochem.* **3**, 277—285 (1959).
- — and M. BROTZ: Studies of white matter. I Chemical constitution and respiration of neuroglial and myelin enriched fractions of white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.* **17**, 430—438 (1958).
- KRBEK, F.: Histochemische und morphologische Untersuchungen an Glia-Satelliten im Rückenmark der weißen Maus. Inaug.-Diss. Würzburg 1955.
- KUBO, Z.: Histochemical studies on brain glycogen and certain enzymes of guinea-pigs and their changes after electric shock. I Acute effects of a single multiple electric shock on brain glycogen. II Chronic effects of repeated electric shock on brain glycogen. III Acute and chronic effects of electric shock on certain enzymes, phosphatases, 5-nucleotidase, adenosine triphosphatase and succinic dehydrogenase. (Jap. Text.) *Arch. Histol. Jap.* (Okayama) **11**, 65—77, 79—89, 113—129 (1956). Abstract in *Excerpta med.* (Amst.), Sect. I **12**, 220 (1958).
- KULENKAMPEFF, H.: Das Verhalten der Neuroglia in den Vorderhörnern des Rückenmarks der weißen Maus unter dem Reiz physiologischer Tätigkeit. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **116**, 304—312 (1952).
- Ependymreaktionen. Eine funktionsmorphologische Untersuchung. *Verh. anat. Ges.* (Freiburg i. Br., 1957) **54**, 138—141 (1958).
- , u. W. KOLB: Mitosen im Ependym der erwachsenen weißen Maus. *Naturwissenschaften* **44**, 241 (1957).
- Die Tageszeit von Tierversuchen und ihre Bedeutung für karyometrische Untersuchungen. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **122**, 121—136 (1960).
- , u. F. KRBEK: Morphologische Untersuchungen an Glia und Ependym des Mäuserückenmarkes. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **121**, 165—178 (1959).
- , u. E. WÜSTENFELD: Funktionsbedingte Veränderungen der Kerngröße von Gliazellen im Grau des Rückenmarkes der weißen Maus. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **118**, 97—101 (1954).
- LEUTHARDT, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie, 13. Aufl. Berlin: W. de Gruyter 1957; 14. Aufl. Berlin: W. de Gruyter 1959.
- LIEBER, A.: Vorschläge zu biologisch einwandfreier Haltung von Anuren zu Laboratoriumsversuchen. *Z. Geburtsh. Frauenheilk.* **12**, 1086—1088 (1954).
- LOWRY, O. H.: In H. WAELSCH, *Biochemistry of the developing nervous system*, p. 350. New York: Academic Press 1955.
- LUMSDEN, C. E.: Cell structure and cell physiology in relation to myelin, p. 148—163. In D. WILLIAMS, *Modern Trends in Neurology*. London: Butterworth 1957.
- Histological and histochemical aspects of normal neuroglia cells, p. 141—161. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- , and C. M. POMERAT: Normal oligodendrocytes in tissue culture. *J. exp. Cell Res.* **2**, 103—114 (1951).
- LUSE, S. A.: The fine structure of the morphogenesis of myelin, p. 59—95. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- McMANUS, J. F. A., and J. C. CASON: Carbohydrate histochemistry studies by acetylation techniques. I. Periodic acid methods. *J. exp. Med.* **91**, 651—654 (1950).

- MICHAELIS, M., and J. H. QUASTEL: The site of action of narcotics in respiratory processes. *Biochem. J.* **35**, 518—533 (1941).
- MURRAY, M. R.: Factors bearing on myelin formation in vitro, p. 201—229. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. Progress in Neurobiology, vol. IV. New York: Hoeber 1959.
- NACHMANSOHN, D.: Metabolism and function of the nerve cell, p. 390—425. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE u. I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- NIESSING, K.: Zellreaktion der Makroglia bei Narkose. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **56**, 173—189 (1950).
- Zur funktionellen Histologie der Hirnkapillaren. *Verh. anat. Ges. (Kiel 1950)* **48**, 42—58 (1951).
- Zellformen und Zellreaktionen der Mikroglia des Mäusegehirns. *Morph. Jb.* **92**, 102—122 (1952).
- Zellreaktionen der Hortege-Glia bei Anwendung pharmakologischer und hormonaler Reize. *Verh. anat. Ges. (Mainz 1953)*, **51**, 266—271 (1954).
- Cytodynamik des Hodens und Nebenhodens beim Siebenschläfer (*Myoxus glis* L., *Glis glis* L.). *Z. Zellforsch.* **43**, 566—593 (1956).
- Zum gegenwärtigen Stand der Neurogliaforschung. *Ber. phys.-med. Ges. Würzburg, N. F.* **68**, 100—114 (1957).
- Gestalt und Formenwandel der Gliazellen. Wissenschaftlicher Film B 751/1957. Göttingen: Institut für den wissenschaftlichen Film 1958.
- , u. H. ROLLHÄUSER: Über den submikroskopischen Bau des Grundhäutchens der Hirnkapillaren. *Z. Zellforsch.* **39**, 431—446 (1953/54).
- , u. W. VOGELL: Das elektronenoptische Bild der sogenannten Grundsubstanz der Hirnrinde. *Z. Naturforsch.* **12b**, 641—646 (1957).
- — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Strukturveränderungen in der Hirnrinde beim Ödem und ihre Bedeutung für das Problem der Grundsubstanz. *Z. Zellforsch.* **52**, 216—237 (1960).
- OKAMOTO, M.: Observations on neurons and neuroglia from the area of the reticular formation in tissue culture. *Z. Zellforsch.* **47**, 269—287 (1957).
- OKSCHÉ, A.: Die Bedeutung des Ependyms für den Stoffaustausch zwischen Liquor und Gehirn. *Verh. anat. Ges. (Stockholm 1956)* **53**, 162—172 (1957).
- Histologische Untersuchungen über die Bedeutung des Ependyms, der Glia und der Plexus chorioidei für den Kohlenhydratstoffwechsel des ZNS. *Z. Zellforsch.* **48**, 74—129 (1958).
- Studien am Subkommissuralorgan. *Verh. anat. Ges. (Zürich 1959)*, **56**, 392—404 (1960).
- OPITZ, E.: Energieumsatz des Gehirns in situ unter aeroben und anaeroben Bedingungen, S. 66—108. In: *Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes*. 3. Colloq. der Ges. für Physiol. Chemie, Mosbach 1952. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952.
- PALAY, S. L.: An electron microscopical study of neuroglia, p. 24—38. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- Diskussionsbemerkung, S. 65. In W. F. WINDLE, *Biology of neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry*. London: Churchill 1953.
- PENFIELD, W.: Neuroglia: normal and pathological. In W. PENFIELD, *Cytology and cellular pathology of the nervous system*, vol. II, p. 423—479. New York: Hoeber 1932.
- POMERAT, C. M.: Dynamic Neurogliology. *Tex. Rep. Biol. Med.* **10**, 885—913 (1952).
- Functional concepts based on tissue culture studies of neuroglia cells, p. 162—175. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- POPE, A.: Implication of histochemical studies for metabolism of the neuroglia, p. 211—222. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- H. H. HESS and J. N. ALLEN: In H. WAELSCH, *Ultrastructure and Cellular Chemistry of Nervous Tissue*, p. 182. New York: Hoeber-Harper 1957.
- QUADBECK, G., u. H. HELMCHEN: Die Blut-Hirnschranke. *Dtsch. med. Wschr.* **82**, 1377—1382 (1957).
- QUASTEL, J. H.: Biochemical aspects of narcosis, p. 648—676. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.

- RACKER, E.: The mechanisms of glycolysis, p. 134—152. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- REICHARDT, M.: Das Hirnödem. Anhang: Die Hirnschwellung. In *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Bd. 13, I B, S. 1229—1283. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- RICHARDS, A. G.: Structure, chemistry and pathology of the central nervous system of arthropods, p. 818—843. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- ROBACK, H. N., u. H. J. SCHERER: Über die feinere Morphologie des frühkindlichen Gehirns unter besonderer Berücksichtigung der Gliaentwicklung. *Virchows Arch. path. Anat.* **294**, 365—413 (1935).
- ROBERTS, E. D. P. DE, H. M. GERSCHENFELD and F. WALD: Some aspects of glial function as revealed by electron microscopy. In IV. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, *Verhandlungen* Bd. II, S. 443—447. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- SATO, T.: Über das Glykogen im Zentralnervensystem. *Trans. Soc. path. jap.* **20**, 207—211 (1930).
- SCHABADASCH, A. L.: Morphology of glycogen distribution and transformation. III. Cytology of glycogen accumulations in the motor cells of the normal nervous system. *Bull. Biol. Méd. exp. USSR.* **7**, 353—357 (1939).
- SCHARRER, E., and B. SCHARRER: Hormones produced by neurosecretory cells. *Recent Progr. Hormone Res.* **10**, 183—240 (1954).
- SCHMIDT, E. S. G.: Der Einfluß des Winterschlafes, des Megaphenschlafes, des Hungerns und verschiedener Kostarten auf die Speicheldrüsen von *Myoxus myoxus*, *Erinaceus europaeus* und *Mus rattus*. *Z. Zellforsch.* **50**, 143—182 (1959).
- SELBERG, W.: Die Glykogenose des Säuglings unter dem Bilde einer tödlich verlaufenden cerebr spinalen Erkrankung. *Z. Kinderheilk.* **72**, 306—320 (1953).
- SHIMIZU, N.: Histochemical studies on the phosphatase of the nervous system. *J. comp. Neurol.* **93**, 201—218 (1950).
- Histochemical studies of glycogen of the area postrema and allied structures of the mammalian brain. *J. comp. Neurol.* **102**, 323—339 (1955).
- , and T. KUMAMOTO: Histochemical studies on the glycogen of the mammalian brain. *Anat. Rec.* **114**, 479—498 (1952).
- SPATZ, H.: Die Bedeutung der „symptomatischen“ Hirnschwellung für die Hirntumoren und für andere raumbeengende Prozesse in der Schädelgrube. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **88**, 790—794 (1929).
- Die Bedeutung der vitalen Färbung für die Lehre vom Stoffaustausch zwischen dem Zentralnervensystem und dem übrigen Körper. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* **101**, 267—358 (1933).
- Die proximale (supraselläre) Hypophyse, ihre Beziehungen zum Diencephalon und ihre Regenerationspotenz, S. 53—77. *Pathophysiologia Diencephalica*. Internat. Symposion, Mailand 1956. Wien: Springer 1958.
- SPERRY, W. M.: The biochemistry of the brain during early development, p. 234—261. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, *Neurochemistry*. Springfield, Ill.: Thomas 1955.
- SUOMALAINEN, P.: Über den Winterschlaf des Igels mit besonderer Berücksichtigung der Enzymtätigkeit und des Bromstoffwechsels. *Ann. Acad. Sci. fenn. A* **45**, 1—115 (1935).
- Über die Physiologie des Winterschlafes. *Ann. Acad. Sci. fenn. A* **56**, 163—179 (1944).
- Winterschlaf: die natürliche Hypothermie der Säugetiere. *Triangel* **2**, 228—234 (1956).
- SVORAD, D.: Die Beziehungen zwischen Körpertemperatur und Konzentration von Gehirnglykogen. *Naturwissenschaften* **46**, 533 (1959).
- TSCHIRGI, R. D.: The blood-brain barrier, p. 130—138. In W. F. WINDLE, *Biology of Neuroglia*. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- VIRCHOW, R.: Über das granuliertes Ansehen der Wandungen der Gehirnventrikel. *Allg. Z. Psychiat.* **3**, 242—250 (1846).
- WALSCH, H.: Diskussionsbemerkung, S. 252. In S. R. KOREY, *The Biology of Myelin*. *Progress in Neurobiology*, vol. IV. New York: Hoeber 1959.

- WEIL-MALHERBE, H.: Der Energiestoffwechsel des Nervengewebes und sein Zusammenhang mit der Funktion, S. 41—65. In: Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes. 3. Coll. der Ges. für Physiol. Chemie, Mosbach 1952. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1952.
- Oxidation mechanisms, p. 95—110. In K. A. C. ELLIOTT, I. H. PAGE and I. H. QUASTEL, Neurochemistry. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1955.
- WINDLE, W. F. (Ed.): Biology of Neuroglia. Springfield, Ill.: Ch. C. Thomas 1958.
- WISLOCKI, G. B., and E. H. LEDUC: Vital staining of the hematoencephalic barrier by silver nitrate and trypan blue, and cytological comparisons of the neurohypophysis, pineal body, area postrema, intercolumnar tubercle and supraoptic crest. *J. comp. Neurol.* **96**, 371—414 (1952a).
- WOLFGRAM, F., and A. S. ROSE: The histochemical demonstration of dehydrogenases in neuroglia. *Exp. Cell. Res.* **17**, 526—530 (1959).
- ZELLWEGER, H.: Glykogenspeicherkrankheiten. *Dtsch. med. Wschr.* **81**, 1907—1914 (1956).
- ZÜLCH, K. J.: Hirnödem und Hirnschwellung. *Virchows Arch. path. Anat.* **310**, 1—58 (1943).

Privatdozent Dr. A. OKSCHE,
Anatomisches Institut der Universität Kiel, Neue Universität, Eingang F 1

Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Medizinischen Universität Budapest
(Vorstand: Prof. Dr. I. TÖRÖ)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN DES AUGES VON PLANARIEN

Von

P. RÖHLICH und L. J. TÖRÖK

Mit 16 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Dezember 1960)

Einleitung

Die Turbellarien sind die niedersten Coelomaten, die bereits das Vermögen eines Richtungssehens haben. Struktur und Funktion des Auges dieser Tiere finden daher schon lange Zeit das Interesse der Forscher. Am eingehendsten wurde bisher das Auge der Süßwasserplanarien (Tricladida, Planariidae) untersucht. Die wichtigsten Erkenntnisse auf diesem Gebiete brachten die mit den klassischen Methoden der Lichtmikroskopie durchgeführten Untersuchungen von J. CARRIÈRE (1881), R. HERTWIG (1881), J. IJIMA (1884), L. BÖHMIG (1887), R. HESSE (1897), E. JÄNICHEN (1897), I. UDE (1908), P. LANG (1913), W. H. TALIAFERRO (1920) und TH. LENDER (1952). Zusammenfassende Darstellungen dieses Problems stammen von L. VON GRAFF (1914), E. BRESSLAU (1933) und L. HYMAN (1951).

Die besondere Bedeutung der Morphologie des Auges der Planarien besteht darin, daß die meisten Arten den Kopf und damit auch die Augen regenerieren können. Das Erscheinen der Augenanlagen ist der wichtigste Indikator für eine normale Kopfregeneration. Die Regeneration der Augen selbst steht neuestens im Mittelpunkt der Untersuchungen. Der Prozeß der Augenregeneration wurde bisher nur lichtmikroskopisch untersucht.

Die genauere Erforschung sowohl des Feinbaues als auch der Regeneration des Auges erfordert aber die elektronenmikroskopische Untersuchung des sich entwickelnden und des vollentwickelten Auges. Vor allem die submikroskopische Struktur der Photorezeptoren des vollausgebildeten Auges ist ein interessantes Problem. Die Regenerationsfähigkeit des Auges bietet gleichzeitig Möglichkeiten für elektronenmikroskopische Untersuchungen der Morphogenese dieser Photorezeptoren. PRESS (1959) war der erste, der über die elektronenmikroskopische Untersuchung des Photorezeptors einer Planarienart (*Dugesia tigrina*) berichtete; auf seine Feststellungen kommen wir zurück.

Die mit klassischen Methoden durchgeführten Untersuchungen beschäftigen sich hauptsächlich mit dem Auge der Süßwasserplanarien bzw. mit seiner Regeneration. Dieser Umstand bestimmte das Material unserer elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Material und Methoden

Es wurde das Auge der Planarien *Dendrocoelum lacteum* und *Dugesia lugubris* untersucht. Es wurden frisch eingesammelte, erwachsene, geschlechtsreife Tiere bearbeitet. Vorfixiert wurde etwa 20 min lang in toto in einer 1%igen, gepufferten Osmiumtetroxydlösung (pH 7,2).

Diese Lösung wurde dem wenigen Brunnenwasser tropfenweise zugegeben, in dem sich die Planarien befanden. Nach dieser Vorfixierung wurde der Kopf der Tiere dicht hinter den Augen abgeschnitten und bei 4° C weitere 2—3 Std in reiner Fixierungsflüssigkeit nachfixiert. Nach der Entwässerung in Alkohol wurde das Material in ein Gemisch von Butyl- und Methylmethacrylat von 5:1 eingebettet. Nach dem Schneiden mit einem Porter-Blum-Ultramikrotom erfolgte die Untersuchung mit dem Tisch-Elektronenmikroskop Tesla BS 242. Photographiert wurde bei einer 2500—8000fachen Direktvergrößerung.

Zur Kontrolle wurden auch etwa 0,1 μ dicke Schnitte mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. An solchen Schnitten untersuchten wir auch die polarisationsoptischen Eigenschaften des Auges. Parallel zu diesen Untersuchungen wurden auch Präparate mit dem üblichen lichtoptischen Verfahren untersucht. Für die histologische Untersuchung wurde das Material in Zenker-Lösung fixiert, in Celloidin-Paraffin nach PÉTERFI eingebettet und mit Ehrlich'schem Hämatoxylin, mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN, mit Molybdat-hämatoxylin oder nach MALLORY gefärbt.

Ergebnisse

a) Die mikroskopische Struktur der Augen

Die Augen der untersuchten Planarienarten sitzen symmetrisch beidseitig am vorderen Ende des Körpers. Im allgemeinen haben die Tiere nur 2 Augen. Die Pigmentbecher der Augen schauen seitwärts und etwas nach vorn. Die Augen sind unter die Epidermis in das Körperparenchym versenkt und stehen durch einen längeren Sehnerven mit dem Zerebralganglion in Verbindung. Über dem Auge der dunkelbraun bis schwarz pigmentierten *Dugesia lugubris* fehlen die Pigmentzellen, so daß es von einem charakteristischen hellen Hof umgeben ist (Abb. 1).

Nach der Einteilung von HESSE (1897) können die Augen nach Maßgabe ihrer Struktur in 2 Gruppen eingereiht werden und zwar in den Typ des *Dendrocoelum lacteum* und der *Planaria (Dugesia) gonocephala*. Das Auge beider Arten ist ein sog. invertiertes Pigmentbecherauge.

Die wichtigsten Strukturelemente des Auges sind der Pigmentbecher und die Sehzellen. Der Pigmentbecher (Abb. 2a und b)

ist ein Hilfsorgan des Auges mit der Wirkung einer Blende; er wird bei *Dendrocoelum lacteum* von einer einzigen Pigmentzelle (HESSE 1897), bei *Dugesia lugubris* von mehreren gebildet. In das Cytoplasma der Pigmentzellen sind sehr viele braunschwarze, kugelige Pigmentgranula eingelagert (Durchmesser etwa 1 μ). Der Zellkern liegt in der Regel an der äußeren Fläche des Pigmentbechers.

Der Pigmentbecher wird von früheren Autoren, vor allem von HESSE, als ein offenes Gebilde beschrieben; weitverbreitet ist das in Lehrbücher übernommene Schema des offenen Pigmentbechers von HESSE. Andere Autoren fanden aber am scheinbar offenen Ende des Pigmentbechers eine Verschlußmembran, die den Namen „Cornealmembran“ erhielt. JÄNICHEN (1897), L. VON GRAFF (1914), LANG (1913), TALIAFERRO (1920) und neuerdings LENDER (1952) und TÖRÖK (1958) wiesen die Verschlußmembran des Pigmentbechers bei *Dugesia lugubris* nach.

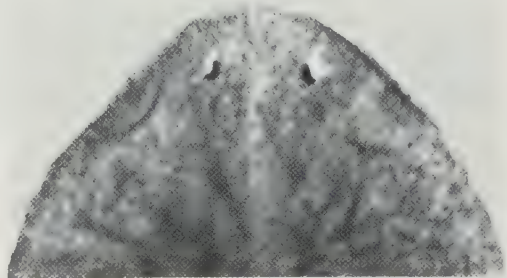


Abb. 1. Kopfe von *Dugesia lugubris* mit den beiden Pigmentbecheraugen. Über den Augen der pigmentfreie Hof. Totalpräparat. 16 \times

Auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnten wir wiederholt feststellen, daß sowohl bei *Dendrocoelum lacteum* als auch bei *Dugesia lugubris* eine äußerst dünne Verschlußmembran vorhanden ist (Abb. 3a und b, VM). Der sog. Pigmentbecher ist also im Grunde genommen kein offener Becher, sondern eine mehr oder weniger abgeflachte Kugel von wechselnder Größe, deren längerer Durchmesser im allgemeinen eine Länge von 50—100 μ besitzt.

Das Innere des Bechers wird von einer durchsichtigen, homogenen Gallerte, dem sog. Glaskörper (Abb. 3a), ausgefüllt. In diese Gallerte sind die Rezeptoren

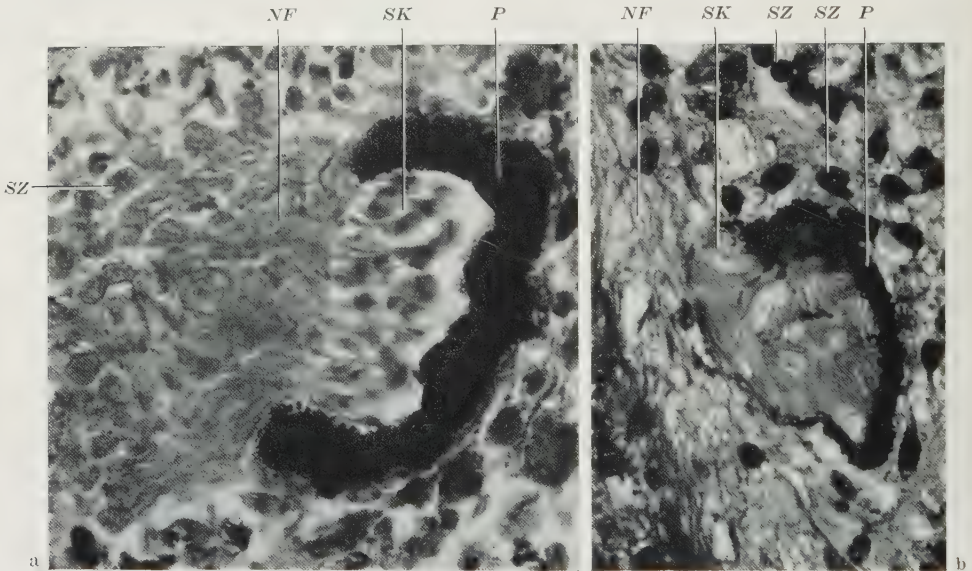


Abb. 2a. Mikroskopisches Bild des Auges von *Dugesia lugubris*. Malloryfärbung. 610 \times . b Mikroskopisches Bild des Auges von *Dendrocoelum lacteum*. Molybdathämatoxylin. 610 \times . P Pigmentbecher; SK Sehkolben; NF Nervenfaser; SZ Sehzelle

der Sehzellen eingebettet. Der Glaskörper kann im allgemeinen nur schwer gefärbt werden; bei *Dendrocoelum lacteum* erhielten wir aber mit dem Mallory-Verfahren eine intensive Blaufärbung.

Die Sehzellen sind lichtempfindliche, bipolare Nervenzellen. Ihre Zahl ist relativ groß; sie beträgt bei *Dendrocoelum lacteum* 30—40, bei *Dugesia lugubris* etwa 100—150. Die Perikaryen der Sehzellen sind bei *Dendrocoelum lacteum* etwas unter und hinter dem Becher (Abb. 2b), bei *Dugesia lugubris* in der Region vor dem Augenbecher gruppiert (Abb. 2a). Der eine Nervenfortsatz der Sehzellen dringt durch die Verschlußmembran des Bechers in den Glaskörper ein, wo der Fortsatz sich verbreitert und in den sog. Sehkolben übergeht. Der andere Nervenfortsatz ist die zentripetale Sehfaser, welche ventral vom Augenbecher zum Zerebralganglion leitet. Das Bündel dieser Fasern bildet den Sehnerv, der an der dorsalen Fläche in das Zerebralganglion eintritt.

Am Sehkolben können schon mit dem Lichtmikroskop verschiedene Teile unterschieden werden. Bei *Dendrocoelum lacteum* verbreitert sich die Nervenfaser unmittelbar hinter der Verschlußmembran und geht in den eigentlichen Sehkolben über, dessen zylinderförmiger Körper bis zur hinteren Wand des Pigment-

bechers reicht. Bei *Dugesia lugubris* sind die Sehkolben eher kegelförmig und sitzen auf verschiedenen langen Stielen, wodurch sie verschieden weit in den Glaskörper hineinragen und den ganzen zur Verfügung stehenden Raum ausfüllen (Abb. 3a). Es wurde auch beschrieben, daß im Stiel der Sehkolben Fibrillen verlaufen, die auch in den Sehkolbenkörper hineinstrahlen.

Die Randzone des Sehkolbens ist nach den meisten Autoren in bezug auf Färbbarkeit und Struktur von den axialen Teilen zu unterscheiden. Die Randzone färbt sich dunkler und ist aus „Stiftchen“ aufgebaut. Die Gesamtheit der Stift-

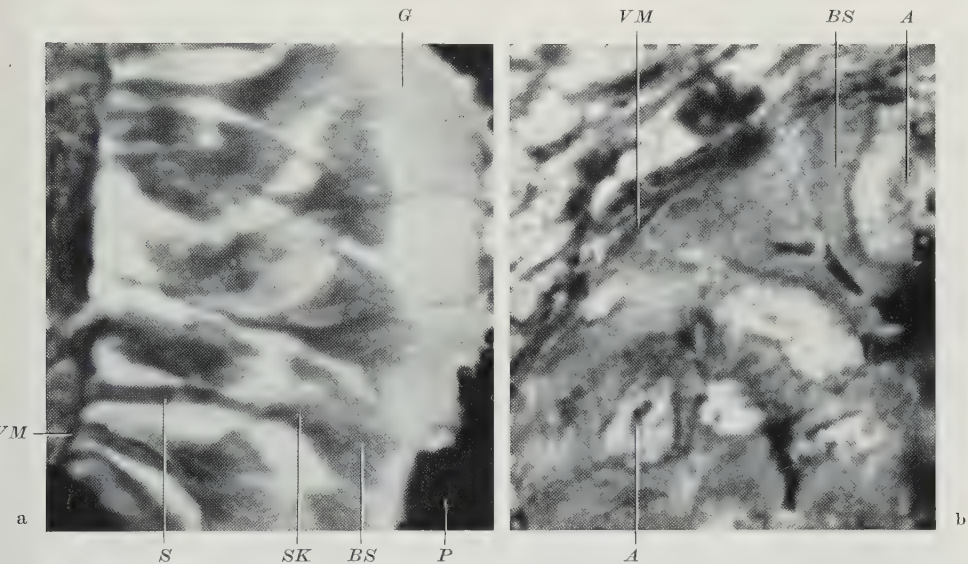


Abb. 3 a u. b. Mikroskopisches Bild der Sehkolben. a *Dugesia lugubris*. Malloryfärbung. 1580 \times . b *Dendrocoelum lacteum*. Molybdänhämatoxylin. 1660 \times . VM Verschlußmembran; S Sehkolbenstiel; SK Sehkolben; BS Bürstensaum; G Glaskörper; P Pigmentbecher; A Achsenteil des Sehkolbens

chen bildet einen Bürstensaum, der im allgemeinen Stiftchenkappe genannt wird. HESSE (1897) beobachtete, daß sich einzelne Elemente dieser Stiftchenkappe in die Fibrillen fortsetzen. Er maß diesem Befund eine physiologische Bedeutung bei. Es gelang aber nicht, diese Struktur bei allen Süßwasserplanarien nachzuweisen. LENDER (1952), der den Feinbau und die Regeneration des Auges der *Dugesia lugubris* eingehend untersuchte, konnte weder Fibrillen noch eine Stiftchenkappe beobachten. Er stellte aber fest, daß sich mit Mallory die Randzone des Sehkolbens violett und der axiale Teil blau färbt. Wir fanden, daß zur Darstellung der Sehkolben die Molybdänhämatoxylin-Färbung bzw. Färbung mit Hämatoxylin, Thionin usw. nach Ammoniummolybdat-Beizung ebenso geeignet ist, wie das Verfahren nach MALLORY. Mit diesen Farbstoffen färben sich die Sehkolben intensiv und ihre Struktur kann gut untersucht werden, so daß der Bürstensaum festgestellt werden kann (Abb. 3a und b).

b) Die submikroskopische Struktur des Auges

Da die Strukturelemente des Auges von beiden Planarienarten weitgehend übereinstimmen, erscheint es zweckmäßiger, in der Folge nur die submikroskopische Struktur des *Dendrocoelum*-Auges eingehender zu behandeln und erst am Ende

des Kapitels die Unterschiede gegenüber dem Bau des *Dugesia*-Auges zusammenzufassen.

Die Struktur der Pigmentzellen. Da wir uns in einer anderen Arbeit mit der Struktur und Entwicklung der Pigmentzellen ausführlich beschäftigen, seien die Ergebnisse nur kurz zusammengefaßt. Wir fanden an Schnitten durch den Pigmentbecher von *Dendrocoelum lacteum* charakteristische Zellgrenzen. Deshalb glauben wir in Abweichung von HESSE (1897), daß der Becher auch aus mehreren Zellen bestehen kann. Die benachbarten Zellmembranen zeigen stellenweise dieselbe strukturelle Gliederung, die wir selbst bei den Epidermiszellen der

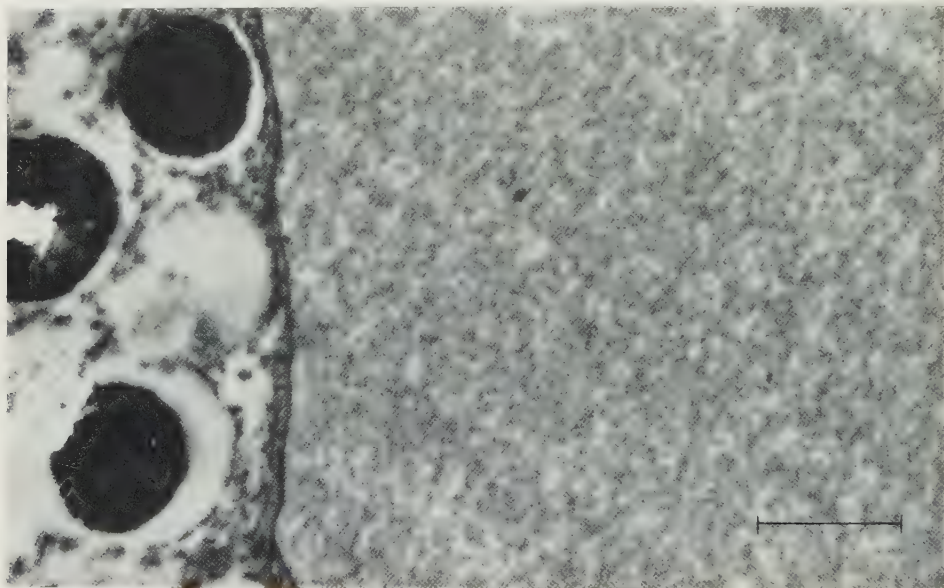


Abb. 4. Teil einer Pigmentzelle und des Glaskörpers aus dem Auge von *Dendrocoelum lacteum*. Links vom feinstrukturierten Glaskörper 3 Pigmentkörnchen. 18 600 \times

Dugesia lugubris beobachtet haben und die WOOD (1959) bei Ektodermzellen von *Hydra* und Schlundepithelzellen von *Dugesia tigrina* nachgewiesen hat. An diesen Stellen zeigen die der Zellmembran benachbarten Cytoplasmazonen eine stärkere Osmiophilie. Diese Zonen entsprechen den sog. Desmosomen (Abb. 12).

Der Kern der Pigmentzellen liegt nahe der äußeren Oberfläche des Bechers. Die Grundmasse des Cytoplasmas ist feingekörnt. Um den Kern findet sich ein endoplasmatisches Reticulum; im Gebiet des Retikulums, zum Teil auch zwischen den Pigmentkörnchen können Mitochondrien beobachtet werden. Die Pigmentgranula füllen den Hauptteil des Zelleibes aus. Die Pigmentkörnchen sind kugelförmig (Durchmesser etwa 1μ). Die Substanz der Pigmentgranula ist dicht und ziemlich homogen, stellenweise können aber in ihnen dunklere, dichtere Flecken beobachtet werden (Abb. 4). Unter dem Polarisationsmikroskop zeigen die Granula eine ausgesprochene Anisotropie (Abb. 5). Demnach dürften sie eine geordnete submikroskopische Struktur besitzen. In einigen elektronenmikroskopischen Bildern schien es so, als ob die Eiweißmatrix der Pigmentkörnchen einen lamellären Bau besäße; die dichte Lagerung des Pigmentes macht aber eine

genaue Beobachtung unmöglich. Die Pigmentkörnchen werden immer von einem hellen Hof umgeben, der wahrscheinlich ein Kunstprodukt ist. Die innere Oberfläche des Pigmentbechers wird von einer glatten Zellmembran gebildet (Abb. 4), die stellenweise an den Glaskörper, an anderen Stellen an die Zellmembranen der Sehkolben grenzt.

Wie schon erwähnt, ist der Pigmentbecher ein vollkommen geschlossenes Gebilde mit eigener Wand, da die Pigmentzellen am scheinbar offenen Ende in die *Verschlußmembran* übergehen. Die Dicke der Membran schwankt zwischen den

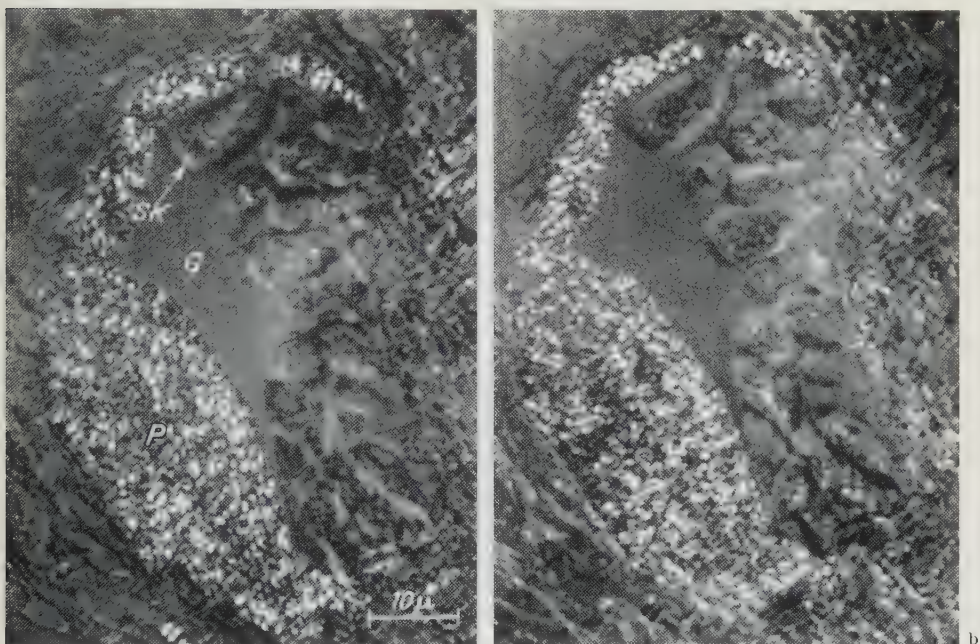


Abb. 5a u. b. Polarisationsmikroskopisches Bild des Auges von *Dendrocoelum lacteum*. Der den Rand des Sehkolbens (*SK*) bildende Bürstensaum und die Pigmentkörnchen (*P*) geben Doppelbrechung. *G* Glaskörper. a Additionsstellung. b Subtraktionsstellung. Dünnschnitt ($0,1 \mu$). $1200 \times$

sehr weiten Grenzen von $50\text{--}5000 \text{ m}\mu$; durchschnittlich ist sie $0,5 \mu$ dick. Die Verschlußmembran zeigt das charakteristische Bild des Cytoplasmas. Auch Mitochondrien können in ihr gefunden werden (Abb. 6). Für die Zugehörigkeit der Verschlußmembran zu den Pigmentzellen spricht, daß in ihr Pigmentkörnchen vorkommen und daß ihr Cytoplasma mit dem dieser Zellen übereinstimmt. Randschnitte des Pigmentbechers zeigen, daß sich das Cytoplasma der Pigmentzellen direkt in jenes der Verschlußmembran fortsetzt (Abb. 6). Die Stellen des Durchtrittes der Nervenfasern durch die Verschlußmembran sind sehr auffallend. Hier sind die benachbarten Zellmembranen und die dazu gehörenden Cytoplasma-bezirke stark osmiophil, was auf eine intensive Beziehung zwischen den Zelloberflächen hinweist.

Die Struktur des Glaskörpers. Das Innere des Pigmentbechers wird zwischen den Sehkolben von einer homogenen Masse ausgefüllt. Manchmal stehen aber die Sehkolben so dicht nebeneinander, daß zwischen ihnen fast kein Glaskörper vorhanden ist. Der Glaskörper zeigt eine mittlere Dichte und bei stärkerer

Vergrößerung eine sehr feine, fibrilläre Struktur (Abb. 4). Die Dicke der Fibrillen beträgt etwa 80—100 Å.

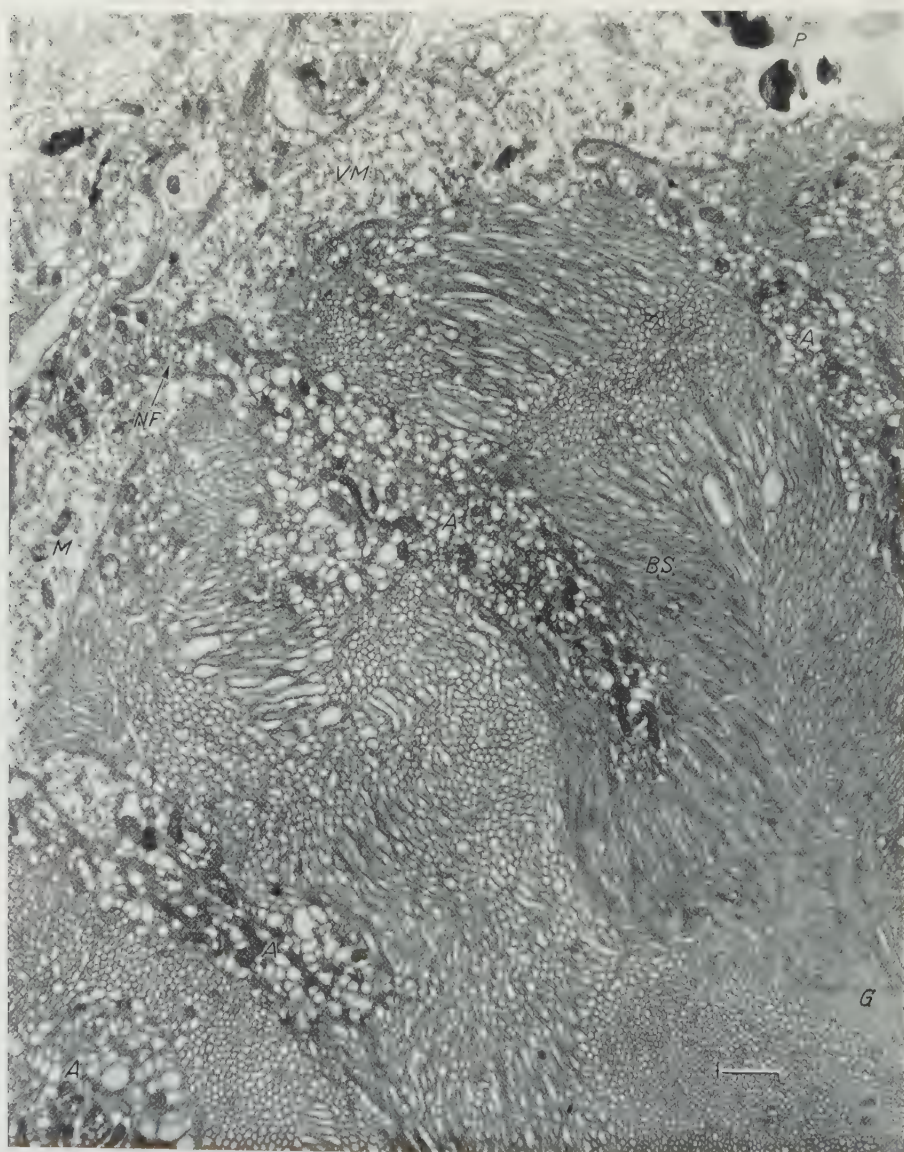


Abb. 6. Übersichtsbild über die Struktur des Auges von *Dendrocoelum lacteum*. Der Inhalt des Auges wird nach außen von der Verschlussmembran (*VM*) — einer pigmentfreien cytoplasmatischen Lamelle der Pigmentzelle (*P*) — abgeschlossen. Der Übergang zwischen dem Rand des Pigmentbeckers und der Verschlussmembran ist gut zu erkennen. Die die Verschlussmembran durchbohrende Nervenfasern (*NF*) setzt sich in den Sehkolben fort. In der Achse (*A*) der Sehkolben zahlreicher Mitochondrien und Vakuolen, während ihre Randzone durch einen aus Mikrozotten bestehenden Bürstensaum (*BS*) gebildet wird. *G* Glaskörper. 11400 ×

Die Struktur der Sehkolben. Der kernhaltige Teil der Sehzellen (Abb. 7) liegt außerhalb des Pigmentbeckers. Der Zellkern ist verhältnismäßig locker gebaut;

er enthält einen exzentrischen, dichteren, kleinen Nucleolus. Die Kernmembran hat einen charakteristischen doppelamellären Bau. Das Perikaryon besitzt eine reich gekörnte Grundstruktur. Die Körnchen sind nicht gleichmäßig verteilt; ihre Größe wechselt von 50—100 Å. Die kleineren Körnchen sind dichter,

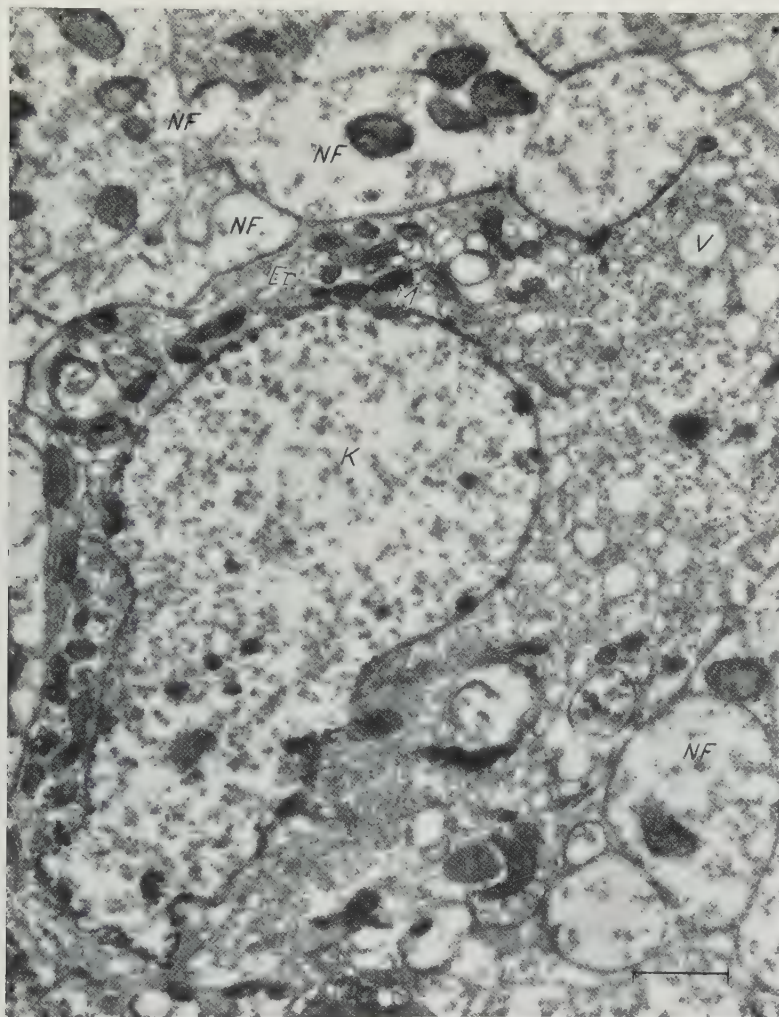


Abb. 7. Perikaryon einer Sehzelle, *Dendrocoelum lacteum*. Im feingranulierten Cytoplasma rund um den Kern (K) sind Mitochondrien (M), verschiedene Vakuolen (V) und ein Teil des Ergastoplasmas (Er) sichtbar. Das Perikaryon von Anschnitten von Nervenfasern (NF) umgeben. 12800 ×

die größeren lockerer strukturiert, und die größten können auch als kleine Vesiculae aufgefaßt werden. Wahrscheinlich bilden diese Körnchen einen Übergang zu den verschiedenen großen Vakuolen des Cytoplasmas. Die Vakuolen können besonders in den weniger gekörnten Bezirken des Cytoplasmas gefunden werden. Das Innere der Vakuolen wird von einer ganz hellen, homogenen Substanz erfüllt. Das Perikaryon enthält viele Mitochondrien; diese sind aber kleiner als die Mitochondrien der Nervenfasern.

Vor der Verschußmembran des Pigmentbechers erkennt man eine sehr komplizierte Struktur. Die Mehrzahl der Strukturelemente gehört zu den distalen Fasern des Sehnerven. Sie verlaufen zum Auge und dringen durch die Verschußmembran in das Innere des Bechers ein. Ihr Cytoplasma ist von ähnlicher Grundstruktur wie das Perikaryon. Im Cytoplasma können Körnchen und Vakuolen beobachtet werden, doch ist das Gefüge viel lockerer als im Perikaryon. Im Inneren der Nervenfasern verlaufen feine Längsfibrillen, die wir als Neurofilamente auffassen. Die Dicke dieser Filamente beträgt 100–200 Å; ihre Zahl

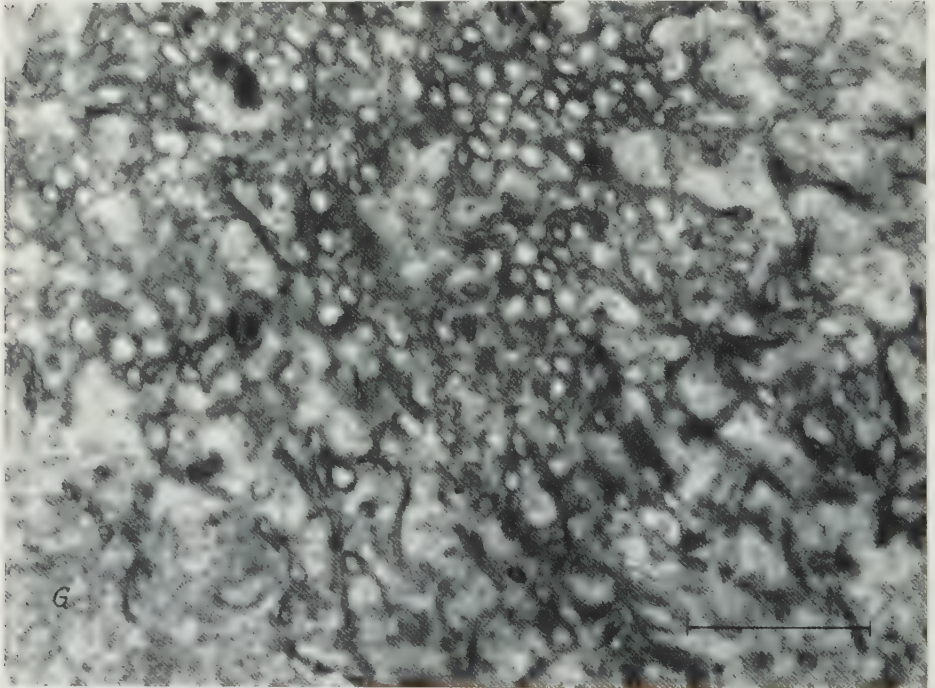


Abb. 8. Querschnitt aus dem distalen Ende des Sehkolbens. *Dendrocoelum lacteum*. Im Glaskörper (G) in verschiedenen Schnittrichtungen getroffene Mikrozotten. 23 800 ×

und Verteilung wechselt in den einzelnen Nervenfasern erheblich. Im Cytoplasma der Nervenfasern können immer Mitochondrien beobachtet werden (Abb. 7). Bemerkenswert ist, daß die Dicke der Nervenfasern sehr stark schwankt. Der Durchmesser der dickeren Fasern beträgt das Mehrfache des Durchmessers der dünnsten Fasern. Die Fasern sind nackt; es gelang uns nie, irgendwelche Hüllen zu beobachten.

Die distalen Fasern setzen sich nach dem Durchtritt durch die Verschußmembran in die Stiele der Sehkolben fort (Abb. 6). Wir haben wiederholt beobachtet, daß die Nervenfasern dicht vor und nach der Verschußmembran stark anschwellen können.

Der eigentliche Sehkolbenteil hat 2 strukturell verschiedene Anteile, nämlich die Achsenpartie in Fortsetzung der Nervenfaser und die Zone des Bürstensaumes oder der Stiftchenkappe (Abb. 6). Der Achsenteil unterscheidet sich zwar nicht wesentlich von der Nervenfaser, zeigt aber doch eine spezielle Differenzierung. Be-

merkwürdig ist die reiche Anhäufung von Mitochondrien im Zentrum; diese Mitochondrien sind meist gestreckt und parallel zur Längsachse angeordnet. Sie enthalten meistens charakteristische längsverlaufende Cristae (Abb. 10, 11). Das Cytoplasma der Mitochondrienzone enthält feine Körnchen, die denen im Zellkörper und in den Fasern der Nervenzellen ähneln. Ihre Größe liegt zwischen 50 und mehreren 100 Å, ihr Bestand ist verschieden dicht. In den größeren Körnchen findet man im allgemeinen zentrale Auflockerungen. Zwischen den Körnchen befinden sich verstreut auch Vesiculae. Auch in der Mitochondrienzone, vor allem aber an der Grenze zwischen Achsenteil und Bürstensaum, gibt

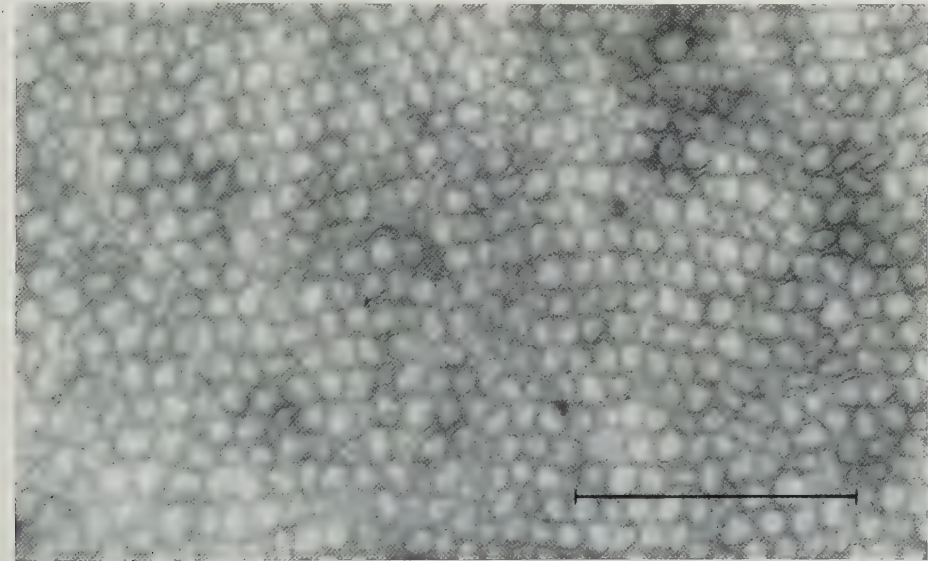


Abb. 9. Querschnitt des Bürstensaumes. *Dendrocoelum lacteum*. Die Mikrozotten des Bürstensaumes von einer dunkleren Membran begrenzt, ihr Inhalt erscheint homogen. 39 000 ×

es in unterschiedlicher Zahl Vakuolen mit ganz besonders hellem Inhalt (Abb. 6, 10, 11). Die Größe der Vakuolen ist recht verschieden (größter Durchmesser etwa $0,5 \mu$). Zwischen Körnchen und Vesiculae bzw. Vesiculae und Vakuolen ist ebenso wie in den Nervenfasern ein stufenweiser Übergang zu erkennen. An Stellen, an denen mehrere Vakuolen vorhanden sind, kann man beobachten, daß die kleinen Vakuolen zu größeren zusammenfließen. In den Sehkolben von Tieren, die längere Zeit hindurch im Dunkeln gehalten wurden, ist die Zahl der Vakuolen im Gegensatz zu den belichteten Tieren auffallend vermehrt. Dieses Problem soll in einer anderen Publikation behandelt werden.

Die Neurofilamente erstrecken sich aus der Nervenfaser in den Achsenteil des Kolbens, aber nicht bis in die Zone des Bürstensaumes.

Die Randzone des Sehkolbens, die als Bürstensaum („Stiftchenkappe“, „rod border“) beschrieben wurde, zeigt eine eigenartige submikroskopische Struktur. Ihr charakteristisches Strukturelement ist ein sehr dichtes System von Mikrotubuli, die nicht verzweigt sind und mehr oder weniger geradlinig und parallel von der Achse zur Oberfläche des Kolbens verlaufen (Abb. 6, 10). An der in den Glaskörper frei hineinragenden Fläche des Sehkolbens ist gut zu erkennen, daß die

Tubuli nach außen abgeschlossen sind und einzeln oder in Gruppen im Glaskörper enden (Abb. 8). Diese Tatsache erklärt, warum die Kolben in den Präparaten keine zusammenhängende äußere Grenzmembran zeigen, bzw. daß diese Membran eigentlich von den Grenzmembranen der Tubuli gebildet wird. Der Zusammenhang zwischen den Tubuli und der Achse des Sehkolbens war auf vielen Bildern nicht genau erkennbar. Andere Aufnahmen zeigten aber klar, daß sich der Inhalt der Tubuli direkt in das Cytoplasma der Sehkolbenachse fortsetzt (Abb. 10). Die genauere Analyse der Bilder und die Untersuchung der sich bei der Regeneration differenzierenden Sehkolben führte zu der Annahme, daß die Tubuli eigentlich

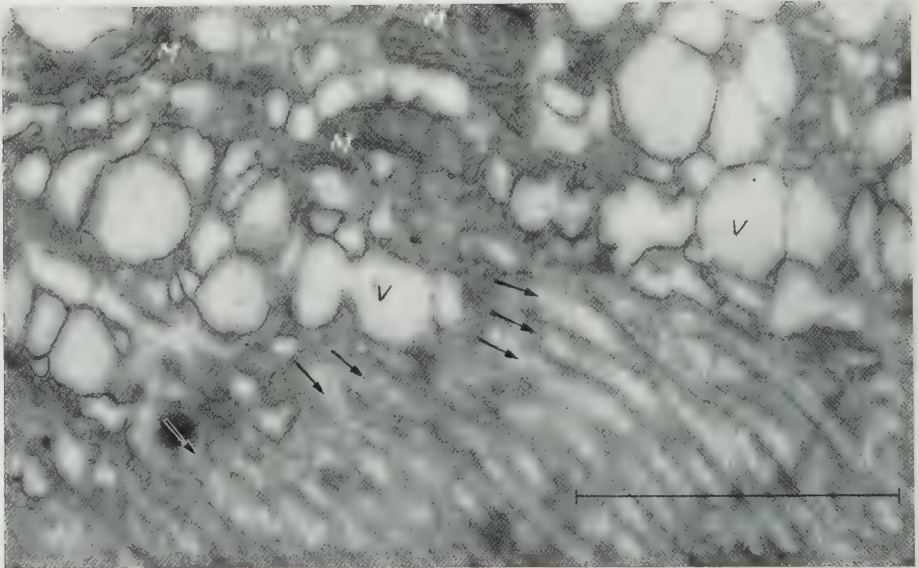


Abb. 10. Grenze der Vakuolen- und Bürstensaumzone (*Dendrocoelum lacteum*). An den bezeichneten Stellen ist der direkte Zusammenhang des Cytoplasmas des Sehkolbens mit dem Inhalt der Mikrozootten zu erkennen. Die Vakuolen (V) scheinen stellenweise zusammenzufießen. M Mitochondrium.
44 000 \times

sehr dünne, lange Cytoplasmafortsätze sind, echte Mikrozootten, die dicht nebeneinandergereiht den eigenartigen Bürstensaum bilden (Abb. 9, 11). Die Breite der Tubuli bzw. Mikrozootten schwankt zwischen 200—1000 Å, ist aber ein und demselben Auge annähernd gleich. In anderen Versuchen konnten wir feststellen, daß die Breite der Zotten vor allem vom funktionellen Zustand des Auges und von der Beleuchtung abhängt. Die Mikrozootten werden von einer doppelamellären Membran begrenzt, deren Dicke ungefähr 50—70 Å beträgt. Das Cytoplasma der Mikrozootten ist ziemlich hell und vollkommen homogen. Der Raum zwischen den Zotten ist meist sehr eng, besonders in der Nähe der Achsenzone. In vielen Fällen ist die Entfernung zwischen 2 Mikrozootten kaum größer als die Dicke der Zellmembran. Die Länge der Mikrozootten kann nur schwer bestimmt werden; sie scheint stark zu variieren. Wahrscheinlich sind die Mikrozootten am Scheitel länger als an den Seiten des Sehkolbens. In einigen Schnitten konnten wir mehrere μ lange Mikrozootten feststellen; ihre Länge kann also auch das 100fache ihrer Breite ausmachen.

Entsprechend der Ordnung der elektronenmikroskopisch feststellbaren Struktur zeigt das Polarisationsmikroskop in der Zone des Bürstensaumes eine positive Doppelbrechung (Abb. 5).

In vielen Fällen füllen die Sehkolben sozusagen den ganzen Raum aus; zwischen ihnen ist kaum etwas vom Glaskörper zu beobachten (Abb. 6). In diesen Fällen fällt es sehr schwer, benachbarte Sehkolben voneinander abzugrenzen. Manchmal scheinen 2 benachbarte Sehkolben an den Berührungsflächen einen einzigen, gemeinsamen Bürstensaum zu besitzen. Eine Erklärung dieser Erscheinung könnte sich vielleicht aus einem Befund an sich entwickelnden Sehkolben ergeben.

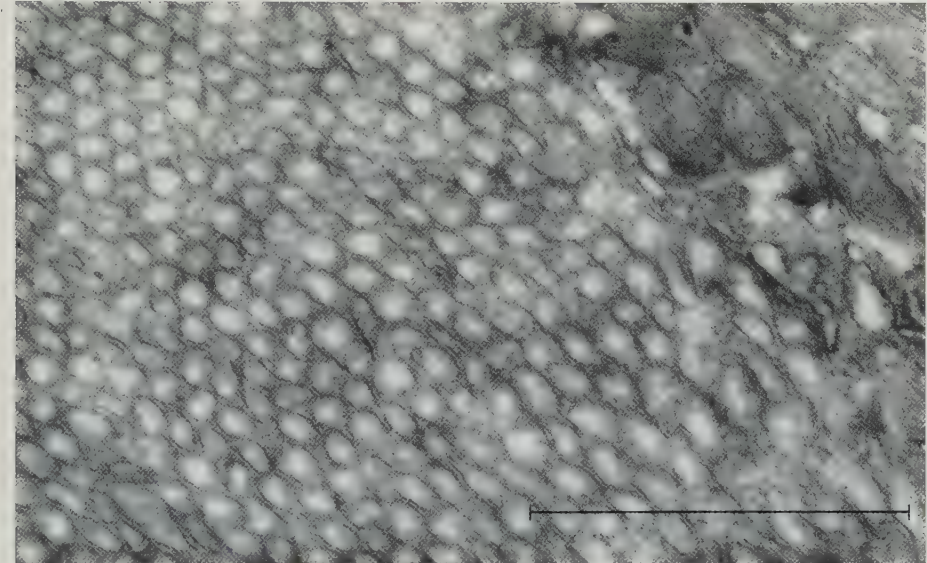


Abb. 11. Ausschnitt aus einem Sehkolben (*Dendrocoelum lacteum*). Der größte Teil des Bildes zeigt Mikrozotten in verschiedenen Schnittrichtungen. In der oberen rechten Ecke eine Gruppe von Mitochondrien mit den charakteristischen Längslamellen. 52600 \times

Wir beobachteten nämlich, daß die Mikrozotten der sich differenzierenden Sehkolben zuerst ziemlich frei stehen. Es kann angenommen werden, daß sich benachbarte Sehkolben durch die Mikrozotten einkeilen (Abb. 15).

Das Auge der *Dugesia lugubris* wurde nur an wenigen elektronenmikroskopischen Präparaten untersucht. Trotzdem konnten aber außer der prinzipiellen Übereinstimmung im Bau einige Unterschiede festgestellt werden. So wird der Pigmentbecher des *Dugesia*-Auges zum Unterschied von denen des *Dendrocoelum*-Auges von mehr Pigmentzellen aufgebaut und die Sehkolben sind zahlreicher. Dementsprechend ist die Dicke der Verschlußmembran größer. Die in ihr sichtbaren Zellgrenzen (Abb. 12, 13) können entweder so gedeutet werden, daß die Verschlußmembran von mehreren Zellen gebildet wird oder, daß sie mehrere nebeneinander eingefügte Fortsätze der Pigmentzellen enthält. Letztere Erklärung halten wir für wahrscheinlicher, da Zellkerne auch mit dem Lichtmikroskop in der Verschlußmembran nicht nachgewiesen werden können. Der Verlauf dieser Zellgrenzen spricht dafür, daß die Zellfortsätze oder Zellen ineinander eingekeilt und teilweise übereinander geschoben sind. Das Cytoplasma erscheint merkwürdig dicht, was durch viele runde oder ovale Anschnitte verursacht

wird (Abb. 12 und 13). Wir nehmen an, daß diese unbekannten Gebilde im Cytoplasma Durchschnitte von Filamenten sind, die in der Ebene der Verschlussmembran verlaufen.

In Übereinstimmung mit dem lichtmikroskopischen Bild sitzen die Sehkolben auf kürzeren oder längeren Stielen und die charakteristische Mikrozothenstruktur (Abb. 14) kann nur am fächerförmig verbreiterten distalen Ende des Sehkolbens beobachtet werden (Abb. 16). Die Nervenfasern, die durch die Verschluss-

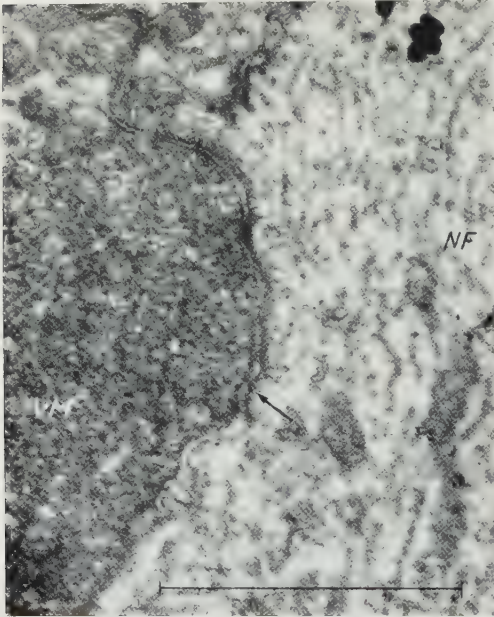


Abb. 12. *Dugesia lugubris*. Teil einer durch die Verschlussmembran durchtretenden Nervenfasern (NF). Runde Anschnitte in der Verschlussmembran (VM), Neurofilamente in der Nervenfasern. Querlinien (↓) zwischen den beiden Zellmembranen (Desmosomi).
40 000 ×

membran durchtreten, sind dicker als die entsprechenden Nervenfasern des *Dendrocoelum*-Auges; sie enthalten auch viel mehr Neurofilamente (Abb. 12 und 13), deren durchschnittliche Dicke 130 Å beträgt. Die Neurofilamente zeigen stellenweise eine Querstreifung. Die Abstände der einzelnen Streifen sind etwas kürzer als der Durchmesser der Filamente. Die Filamente können im Stiel des Kolbens bis zu den Mikrozothen verfolgt werden; ein Zusammenhang mit den Mikrozothen wurde aber nicht eindeutig festgestellt.

Im breiten Teil des Sehkolbens sind viele Mitochondrien, deren Längsachse parallel zur Verlaufsrichtung der Neurofilamente geordnet ist. Sie enthalten nicht die üblichen Cristae, sondern mit der inneren Grenzmembran der Mitochondrien stehen röhrenartige Gebilde im Zusammenhang.

Dieser Eindruck kann aber auch dadurch erweckt werden, daß die Cristae ungewöhnlich schmal sind. Ähnliche Mitochondrien wurden bereits in den intraepidermalen Nervenfasern desselben Tieres beschrieben (TÖRÖK und RÖHLICH 1959). Die im *Dendrocoelum*auge beobachteten hellen Vakuolen sind auch bei *Dugesia lugubris* zwischen den Mitochondrien und an den Abgangsstellen der Mikrozothen zu finden.

Besprechung

Der Vergleich der Ergebnisse, die mit Licht- und dem Elektronenmikroskop über die Struktur der Augen von Planarien gewonnen wurden, erlaubt 2 allgemeine Schlüsse. Die erste Folgerung ist, daß genaue Beobachtungen mit dem Lichtmikroskop auf Strukturen *hinweisen* können, deren eingehendere Untersuchung mit diesem Instrument nicht mehr möglich ist. Solche Befunde können aber bei der Deutung elektronenmikroskopischer Bilder eine wertvolle Rolle spielen. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen ist der Bürstensaum der

Sehkolben ein gutes Beispiel für diesen Fall. Zweitens muß festgestellt werden, daß bei der Deutung von Strukturen, die an der Grenze der Auflösung des Lichtmikroskopes liegen, größte Vorsicht geboten ist. Beobachtungen nur mit Hilfe des Lichtmikroskopes führen allzuleicht zu falschen Schlüssen. Wir denken dabei an die früheren Befunde, wonach Strukturelemente des Bürstensaumes sich direkt in Neurofibrillen fortsetzen sollten (HESSE 1897). Für die Untersuchung und funktionelle Deutung von Strukturelementen dieser Größenordnung ist das Elektronenmikroskop unentbehrlich geworden.

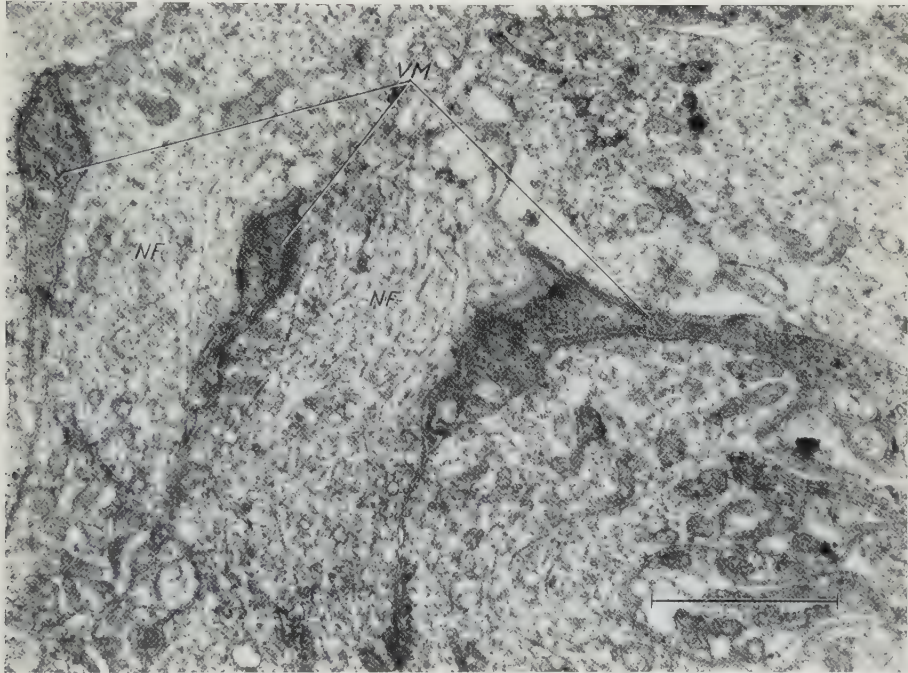


Abb. 13. Durchtrittsstelle von 2 Nervenfasern (NF) durch die Verschlusssmembran (VM) von *Dugesia lugubris*. 32 000 \times

Auf Grund unserer Untersuchungen über den Pigmentbecher möchten wir das Problem der Verschlusssmembran („Cornealmembran“) hervorheben. Die Literaturangaben zeigen, daß es einigen Autoren nicht gelang, dieses Gebilde zu erkennen; andere dagegen beschrieben die Verschlusssmembran. Dieser Widerspruch ergibt sich daraus, daß die Verschlusssmembran auch bei Individuen derselben Art recht verschieden dick sein kann. Meistens ist sie so dünn, daß ihre Dicke an der Grenze des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops, manchmal aber sogar darunter liegt. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen, daß eine solche Grenzmembran in allen Fällen vorhanden ist und zweifellos zu den Pigmentzellen gehört. Im Prinzip ist die Verschlusssmembran eine pigmentfreie cytoplasmatische Lamelle der Pigmentzellen. Die Tatsache, daß in ihr manchmal einzelne Pigmentkörnchen eingeschlossen sind und mitunter Sehkolben beobachtet werden können, die in der Nähe der Verschlusssmembran eine pigmentierte Cytoplasmaschicht durchdringen, weist darauf hin, daß die Verschlusssmembran zu den Pigmentzellen gehört. Der sog. Augenbecher des Planarienauges ist also kein

offener Becher, sondern eine vollkommen *geschlossene*, abgeflachte Kugel. Die Wand dieser Kugel wird zum Teil von einer lichtabschattenden pigmentierten Zellage, zum Teil aber von einer nichtpigmentierten, durchsichtigen Cytoplasmalamelle gebildet.

Der für das Verständnis von Struktur und Funktion der Sehzellen interessanteste Teil ist der Sehkolben. Mit ihm beschäftigen sich schon seit langem viele Autoren. Dabei wurden der Bürstensaum und die fibrilläre Struktur in der Achse des Sehkolbens beschrieben und die Frage nach ihrer funktionellen Bedeutung

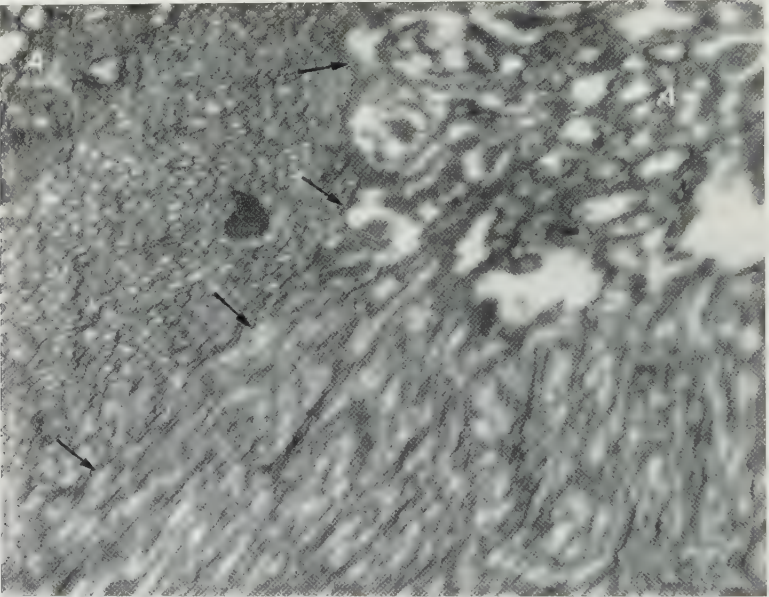


Abb. 14. Zwei Sehkolben aus dem Auge von *Dugesia lugubris*. Die aus dem Achsenteil (A) der Sehkolben ausstrahlenden Mikrozootten rechts im Längsschnitt, links im Querschnitt. Der Pfeil gibt die Grenze der beiden Mikrozoottenzonen an. 24 000 \times

gestellt. HESSE (1897) schreibt z. B.: „Es ist wohl kaum abzuweisen, wenn man den Stiftchen eine besondere Wichtigkeit für das Zustandekommen der Lichtwahrnehmung zuschreibt.“ Weiter heißt es: „Der Umstand, daß die einzelnen Stiftchen in die Fibrillen übergehen, die das Zellplasma und wohl auch den Nervenfortsatz zusammensetzen, ist geeignet, ihre Wichtigkeit in ein helles Licht zu setzen: man wird geradezu hingeführt zu der Ansicht, daß die Erregung, die in den einzelnen Stiftchen erzeugt wird, durch das ansitzende Fäserchen weitergeleitet wird“.

Auf Grund der elektronenmikroskopischen Untersuchungen müssen die lichtmikroskopischen Befunde neu gewertet werden. Die früheren Forscher haben zweifellos den Bürstensaum beobachtet, konnten aber die einzelnen Elemente („Stiftchen“) dieses Saumes nicht mehr erkennen, da ihre Größe unterhalb der Auflösung des Lichtmikroskopes liegt. Die früher beschriebenen Strukturelemente des Bürstensaumes entstanden wahrscheinlich als Kunstprodukte durch Zusammenballung mehrerer submikroskopischer Stiftchen bzw. Mikrozootten. Ebenso müssen auch die beschriebenen fibrillären Strukturen gewissermaßen als

Kunstprodukte betrachtet werden. Die echten Fibrillen, richtiger gesagt Filamente, besitzen submikroskopische Dimensionen und scheinen nicht bis in die Zone des Bürstensaumes zu reichen. Das in der Achse des Sehkolbens als Fibrillenbündel beschriebene dunklere Gebiet entspricht unserer Ansicht nach einer Anhäufung von Mitochondrien, die aber nur mit dem Elektronenmikroskop identifiziert werden konnten.

Auf Grund der elektronenmikroskopischen Bilder ist der Bürstensaum ein System von cytoplasmatischen Mikrozothen. Ähnliche Strukturen wurden bisher

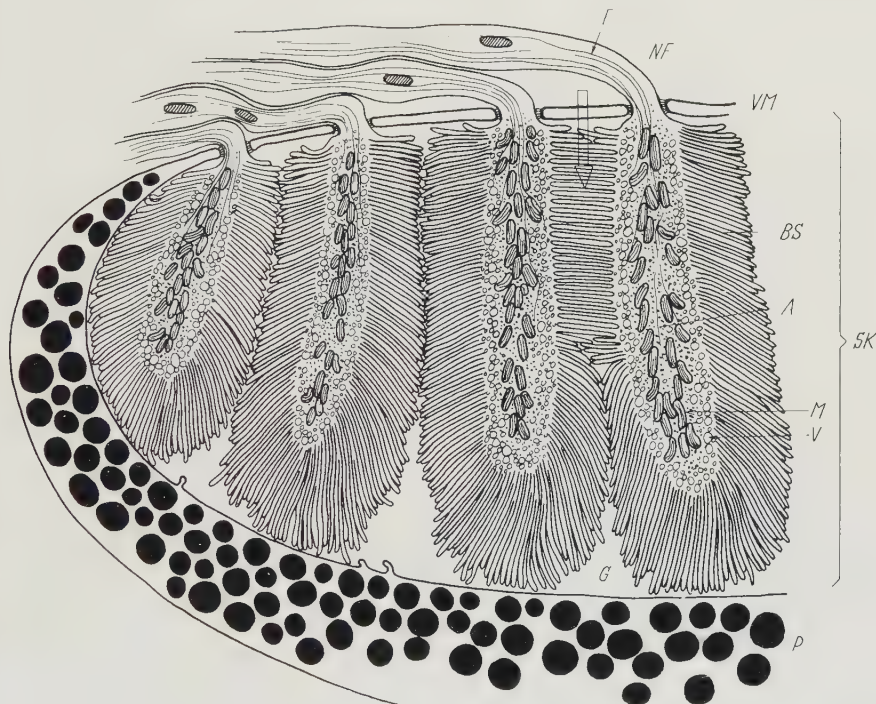


Abb. 15. Schema der Feinstruktur des Auges von *Dendrocoelum lacteum*. *P* Pigmentbecher, *VM* Verschlussmembran; *NF* Nervenfasern; *F* Neurofilamente; *G* Glaskörper; *SK* Sehkolben; *A* Achse des Sehkolbens; *BS* Bürstensaum; *M* Mitochondrien; *V* Vakuolen; ↓ Stelle, an der die Mikrozotten ineinander eingeklinkt sind

in den Photorezeptoren einiger Cephalopoden (*Octopus*, *Sepia*), des *Limulus* und einiger Insektenarten gefunden (FERNÁNDEZ-MORÁN 1958; GOLDSMITH und PHILPOTT 1957; MILLER 1957/58; MOODY und ROBERTSON 1960; WOLKEN 1956/57; WOLKEN, MELLON und CONTIS 1957; WOLKEN, CAPENOS und TURANO 1957). Diese Autoren beschreiben im allgemeinen die Mikrotubuli, klären aber meistens ihre Entwicklung und ihren Zusammenhang mit den übrigen Teilen der Sehzellen nicht. MILLER (1957/58) spricht aber im Zusammenhang mit den Photorezeptoren des *Limulus* von cytoplasmatischen Mikrozootten. Dieselbe Ansicht entwickeln MOODY und ROBERTSON (1960) über die Photorezeptoren des *Octopus*. Diese Autoren begründen ihre Meinung zum Teil damit, daß die doppellamelläre Wandmembran der Mikrotubuli nach Dicke und Struktur mit der Cytoplasmamembran identisch ist, daher also der „unit membrane“ nach ROBERTSON

entspricht (ROBERTSON 1957). Diese Feststellung bestätigen auch unsere Untersuchungen des Planarienauges, da die doppellamelläre Membran der Mikrozottenwand nach Osmiumfixierung 50—70 Å dick ist.

Das Vorhandensein einer Mikrozottenstruktur in den Photorezeptoren der Wirbellosen wurde von uns auch am Auge der Weinbergschnecke (*Helix pomatia*) festgestellt (RÖHLICH und TÖRÖK 1960b). Durch den Vergleich unserer Ergebnisse konnten wir die grundlegende Übereinstimmung der Photorezeptoren von

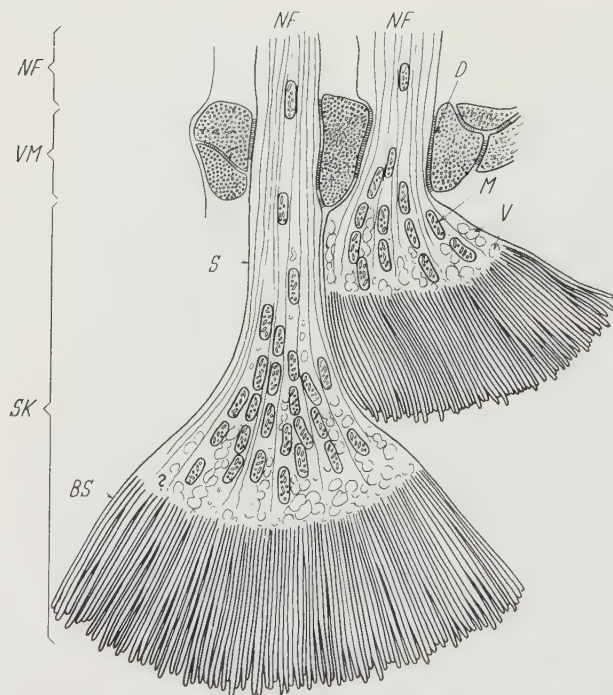


Abb. 16. Schema von 2 Schkolben im Auge von *Dugesia lugubris*. Eine der durch die Verschlussmembran (VM) durchtretenden Nervenfasern (NF) setzt sich im Stiel (S) des Schkolbens fort (links), während die andere ohne Stiel unmittelbar in den Schkolben übergeht (rechts). D Desmosom; SK Schkolben; M Mitochondrien; V Vakuolen; BS Bürstensaum

Planarien und *Helix pomatia* bestätigen. Diese strukturelle Ähnlichkeit spricht unserer Ansicht nach für eine Homologie der Photorezeptoren dieser Tiergruppen, die phylogenetisch nahe verwandt sind. Unseres Erachtens sind die Meinungen, daß gewisse morphologische Ähnlichkeiten im Bau der Augen und Photorezeptoren der Planarien und Wirbeltiere die Homologie dieser Organe beweisen würden (PRESS 1959, WOLKEN 1958b), nicht genügend begründet. Wir glauben, daß die Bilder von PRESS (1959) eine lamelläre Gliederung des Planarienphotorezeptors nicht bestätigen können. Es scheint uns, daß der Verfasser

die von ihnen abgebil-

deten Längsschnitte der parallel verlaufenden Mikrozotten als eine lamelläre Struktur aufgefaßt hat. Im Zusammenhang mit dem Homologie-Problem sei noch bemerkt, daß beim Vergleich von Turbellarien und Wirbeltieren, selbst dann, wenn gewisse morphologische Ähnlichkeiten gegeben sind, nur von einer Analogie gesprochen werden darf.

Der sog. Bürstensaum der Sehzellen von Turbellarien und anderen Wirbel-

ist. In diesem Zusammenhang sind die Ausführungen von WOLKEN u. Mitarb. beachtenswert (WOLKEN 1956; WOLKEN, MELLON und CONTIS 1957; WOLKEN, CAPENOS und TURANO 1957; WOLKEN 1958). Nach diesen Autoren bilden die an der Photorezeption teilnehmenden Sehpigmentmoleküle eine monomolekulare Schicht zwischen der dichteren Lipoid- und weniger dichten Eiweißschicht der Zellmembran. Es kann angenommen werden, daß bei der Erregungsleitung — im Einklang mit der Membrantheorie — die Membran des Sehkolbens und der Nervenfasern die Hauptrolle spielt. Diese Annahme wird in unseren Versuchen durch 2 Befunde bekräftigt: 1. Die Grenzmembran der Mikrozotten setzt sich direkt in die Zellmembran des Stieles bzw. der Nervenfaser fort. 2. Die Mikrozotten stehen mit keinem intrazellulären Gebilde (Filament) im Zusammenhang, das als Leitstruktur betrachtet werden könnte.

Für das Auge der Planarien charakteristische Elemente sind neben dem Bürstensaum die Vakuolen der Sehkolben. Es handelt sich keineswegs um Kunstprodukte, da sie regelmäßig vorkommen und auch in den am besten fixierten und vorbereiteten Präparaten vorhanden sind. Auf ihre funktionelle Bedeutung weist die Beobachtung, daß in den im Dunkeln gehaltenen Tieren Größe und Zahl der Vakuolen zunehmen, während sie kleiner werden, wenn man die Tiere dem Licht aussetzt. Das besondere Material das die Vakuolen ausfüllt, erscheint oft auch in den Mikrozotten, besonders bei Dunkel-Tieren. In diesen Fällen schwellen die Mikrozotten an. Wir glauben annehmen zu dürfen, daß in den Vakuolen ein Stoff angereichert wird, der bei den biochemischen Vorgängen der Photorezeption eine Rolle spielt. Es darf auch vermutet werden, daß dieser Stoff in den Mikrozotten bzw. in ihrer Membran durch die Lichteinwirkung abgebaut und vom Achsenteil des Sehkolbens aus fortlaufend ersetzt wird. In dieser Beziehung sind die früheren Untersuchungen sehr interessant, wonach bei vitalen Untersuchungen im Auge der Planarien eine rötliche Färbung zu erkennen ist. Nach HESSE (1897) soll der Bürstensaum von *Planaria torva* diesen roten Farbstoff enthalten. HESSE beobachtete auch, daß die rötliche Farbe der Sehkolben bei Beleuchtung allmählich verblaßt. Er nimmt an, daß es sich hierbei um einen dem Sehpurpur ähnlichen Stoff handelt.

Was die Bildung der Vakuolen bzw. ihres Inhaltes betrifft, so sind wir vorläufig auf Mutmaßungen angewiesen. Die Analyse der elektronenmikroskopischen Bilder läßt die Deutung zu, daß die Vakuolen aus den Vesiculae entstehen und diese wiederum aus bestimmten Körnchen des Cytoplasmas. Auch den im Achsenteil des Sehkolbens angehäuften Mitochondrien muß eine besondere funktionelle Bedeutung beigemessen werden. Sie dürften Energiespender für die „Neurosekretion“ und für die biochemischen Prozesse der Photorezeption sein.

Die „Neurosekretion“ ist nicht nur auf die Sehkolben beschränkt, sondern kann auch im Perikaryon der Sehzellen und in den distalen Nervenfasern beobachtet werden. Dies könnte darauf hinweisen, daß das im Auge gebildete „Neurosekret“ nicht nur bei der eigentlichen Photorezeption, sondern vermutlich auch bei anderen Vorgängen eine Rolle spielt.

Zusammenfassung

Es wurde das Auge der Süßwasserturbellarien *Dugesia lugubris* und *Dendrocoelum lacteum* mit dem Elektronenmikroskop untersucht. Im Feinbau stimmen

die Augen beider Arten im wesentlichen überein. Das eigentliche Auge besteht aus dem Pigmentbecher und den zur Photorezeption differenzierten Nervenendigungen der bipolaren Sehzellen, den sog. Sehkolben. Das Cytoplasma der Pigmentzellen wird von durchschnittlich $1\ \mu$ großen kugeligen, mehr oder weniger homogenen Pigmentkörnchen erfüllt. Der Zellkern liegt in der äußeren pigmentfreien Zone des Cytoplasmas. Vor allem dort können auch das endoplasmatische Reticulum und die Mitochondrien beobachtet werden. Der sog. Pigmentbecher ist ein allseitig geschlossenes Gebilde, dessen pigmentfreier Teil von einer Verschlussmembran, der sog. Cornealmembran, gebildet wird. Diese Verschlussmembran ist ein cytoplasmatischer, nichtpigmentierter, lamellär gebauter Fortsatz der Pigmentzellen. Der distale Fortsatz der Sehzellen dringt durch die Verschlussmembran in das Innere des Auges ein. Im Inneren des Pigmentbeckers wird der Raum zwischen den Sehkolben vom homogenen Glaskörper ausgefüllt. Dieser zeigt in osmiumbehandelten Präparaten eine mittlere Dichte und mit stärkerer Vergrößerung eine sehr feine fibrilläre Struktur. Der kernhaltige Teil der Sehzellen liegt außerhalb des Pigmentbeckers. Der Kern ist verhältnismäßig locker gebaut, enthält einen kleinen exzentrisch liegenden Nucleolus und wird von einer doppelamellär gebauten Kernmembran begrenzt. Das Perikaryon besitzt eine feinkörnige Grundstruktur. Die Durchmesser der Körnchen wechseln von 50 bis zu mehreren 100 Å; ihre Struktur zeigt einen Übergang über die Vesiculae zu den Vakuolen des Cytoplasmas. Die verschiedenen großen Vakuolen des Cytoplasmas sind von einer hellen, homogenen Substanz erfüllt. Das Perikaryon enthält auch Mitochondrien. Die Grundstruktur der distalen Fasern der Sehzellen ist ähnlich wie die des Perikaryons, enthält aber auch 100—120 Å dicke Neurofilamente. Die Nervenfasern sind nackt und recht verschieden dick. Die distale Faser der Sehzellen durchbohrt die Verschlussmembran und setzt sich in den Sehkolben fort. Der Stiel — bei *Dugesia lugubris* — ist prinzipiell ebenso gebaut wie die Nervenfasern; er ist ihre intraokulare Fortsetzung. Auf diesem Stielteil sitzt der eigentliche Sehkolben. Er besteht im allgemeinen aus 2 verschiedenen Teilen: aus der in der Fortsetzung des Stieles liegenden Achsenzone und aus der Zone des Bürstensaumes (Stiftchenkappe). In der Achse des Sehkolbens liegen viele Mitochondrien. Die Struktur des Cytoplasmas der Achsenzone ist ähnlich wie jene im Perikaryon bzw. in der Nervenfasern. Auffallend sind in der Achsenzone viele von einer hellen, homogenen Substanz erfüllte, verschieden große Vakuolen. Ihre Zahl hängt vom Funktionszustand des Auges ab. Die Randzone des Sehkolbens ist der Bürstensaum, der von cytoplasmatischen Mikrozootten gebildet wird. Die Breite der Mikrozootten wechselt von 200—1000 Å. Die Dicke der etwas dunkleren Grenzmembran beträgt 50—70 Å, der Inhalt der Mikrozootten erscheint homogen. Der Bürstensaum gibt im Polarisationsmikroskop eine positive Doppelbrechung. Die Bürstensaumzone, die eine Vergrößerung der Membranoberfläche bewirkt, dürfte im Dienste der Photorezeption stehen.

Literatur

- BÖHMIG, L.: Zur Kenntnis der Sinnesorgane der Turbellarien. Zool. Anz. **10**, 484—488 (1887).
 BRESSLAU, E.: Turbellaria. In Handbuch der Zoologie, herausgeg. von W. KÜENTHAL u. T. KRUMBACH, Bd II, Teil 1. 1933.
 CARRIÈRE, J.: Die Augen von *Planaria polychroa* (Schmidt) und *Polycelis nigra* (Ehrbg.). Arch. mikr. Anat. **20**, 160—174 (1881).

- FERNANDEZ-MORÁN, H.: Fine structure of the light receptors in the compound eyes of insects. *Exp. Cell Res. Suppl.* **5**, 586—644 (1958).
- GOLDSMITH, H., and D. E. PHILPOTT: The microstructure of the compound eyes of insects. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 429—440 (1957).
- GRAFF, L. v.: Turbellaria: Tricladida. In H. G. BRONN, *Klassen und Ordnungen des Tier-Reichs*, Bd. 4. Leipzig: C. F. Winter 1917.
- HERTWIG, R.: Über das Auge der Planarien. *Jena. Z. Naturwiss.* **14**, 55—56 (1880).
- HESSE, R.: Untersuchungen über die Organe der Lichtempfindung bei niederen Tieren. II. Die Augen der Plathelminthen, insonderheit der Tricladen Turbellarien. *Z. wiss. Zool.* **62**, 527—582 (1897).
- HYMAN, L. H.: The invertebrates: plathelminthes and rhynchocoela. New York: McGraw Hill Book Comp. 1951.
- IJIMA, J.: Untersuchungen über den Bau und die Entwicklungsgeschichte der Süßwasser-Dendrocoelen. *Z. wiss. Zool.* **40**, 359—464 (1884).
- JÄNICHEN, E.: Beiträge zur Kenntnis des Turbellarienauges. *Z. wiss. Zool.* **62**, 250—286 (1897).
- LANG, P.: Beiträge zur Anatomie und Histologie von *Planaria polychroa*. *Z. wiss. Zool.* **105**, 136—155 (1913).
- LENDER, TH.: Le rôle inducteur du cerveau dans la régénération des yeux d'une planaire d'eau douce. *Bull. Biol.* **86**, 140—215 (1952).
- MILLER, W. H.: Morphology of the ommatidia of the compound eye of limulus. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 421—428 (1957).
- Fine structure of some invertebrate photoreceptors. *Ann. New York Acad. Sci.* **74**, 204 bis 209 (1958).
- MOODY, M. F., and J. D. ROBERTSON: The fine structure of some retinal photoreceptors. *J. biophys. biochem. Cytol.* **7**, 87—91 (1960).
- PRESS, N.: Electron microscope study of the distal portion of a planarian reticular cell. *Biol. Bull.* **117**, 511—517 (1959).
- ROBERTSON, J. D.: New observations on the ultrastructure of the membranes of frog peripheral nerve fibers. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 1043 (1957).
- RÖHLICH, P., and L. J. TÖRÖK: Photoreceptor structures in the planarian eye and their morphogenesis during regeneration. *Proc. Europ. Reg. Conf. Electron Microscopy*, Delft 1960a.
- Noch nicht mitgeteilte Untersuchungen 1960b.
- TALIAFERRO, W. H.: Reactions to light in planaria maculata with special reference to the function and structure of the eyes. *J. exp. Zool.* **31**, 69—116 (1920).
- TÖRÖK, L. J.: Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Nervensystems in den Regenerationserscheinungen von *Dugesia lugubris*. Kandidatsdissertation. [Ungarisch.] Budapest 1958.
- , and P. RÖHLICH: Contributions to the fine structure of the epidermis of *Dugesia lugubris* O. *Schm. Acta biol. hung.* **10**, 23—48 (1959).
- UDE, J.: Beiträge zur Anatomie und Histologie der Süßwassertricladen. *Z. wiss. Zool.* **89**, 308—370 (1908).
- WOLKEN, J. J.: Photoreceptor structures. I. Pigment monolayers and molecular weight. *J. cell. comp. Physiol.* **48**, 349—370 (1956).
- Retinal structure. Mollusc cephalopods: octopus, sepia. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 835—838 (1958a).
- Studies of photoreceptor structures. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **74**, 164—181 (1958b).
- WOLKEN, J. J., J. CAPENOS and A. TURANO: Photoreceptor structures. III. *Drosophila melanogaster*. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 441—448 (1957).
- A. D. MELLON and G. CONTIS: Photoreceptor structures. II. *Drosophila melanogaster*. *J. exp. Zool.* **134**, 383—410 (1957).
- WOOD, R. L.: Intercellular attachment in the epithelium of hydra as revealed by electron microscopy. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 343—351 (1959).

Aus dem Anatomischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. NIESSING)*, dem Laboratorium für Elektronenmikroskopie (Leiter: Dr. W. VOGELL) und der Frauenklinik (Direktor: Prof. Dr. H. HUBER) der Philipps-Universität Marburg/Lahn

VERGLEICHENDE ELEKTRONEN- UND LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AM VAGINALEPITHEL IN DER SCHWANGERSCHAFT ** ***

Von

G. PETRY, L. OVERBECK und W. VOGELL

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Februar 1961)

Die periodischen Veränderungen in Geweben der weiblichen Genitalorgane geben dem Morphologen die Möglichkeit, physiologische Funktionsunterschiede zu untersuchen, die an anderen Geweben des Organismus in diesem Ausmaß unter experimentell gesetzten Reizen kaum zu erreichen sind. Wohl kommt es allgemein bei mehrschichtigen Plattenepithelien, die hier zur Diskussion stehen, zu einer ständigen, durch Abnutzung bedingten Neubildung, so daß man, wie z. B. bei der Epidermis geradezu von einer „Sekretion“ spricht. Wir kennen jedoch bei weitem noch nicht die Ursachen dieser ständigen Erneuerung und nur zum Teil die morphologischen Veränderungen, die zur Abstoßung oberflächlicher Zellen führen. Das Vaginalepithel erscheint uns wegen seiner der Ovarialfunktion parallel laufenden und damit bis zu gewissen Grenzen kontrollierbaren Veränderungen als geeignetes Objekt für systematische Untersuchungen *morphologischer Veränderungen der Epithelzellen auf ihrem Weg von der Basis bis zur Oberfläche*.

Seitdem besonders durch die Veröffentlichung von PAPANICOLAOU (1930) gesichert ist, daß Proliferation und Wachstum des Vaginalepithels auch beim Menschen von der Follikelhormoneinwirkung abhängen und daß das vaginale Zellbild, entsprechend der jeweiligen hormonalen Situation, charakteristischen zyklischen Schwankungen unterliegt, sind zahlreiche Untersuchungen über das zytologische Bild des Vaginal-„Sekrets“ in den verschiedenen Lebensphasen der Frau und bei hormonalen Störungen angestellt worden. Das vaginale Abstrichverfahren wurde inzwischen zu einer sehr differenzierten Methode ausgebaut, die in der gynäkologischen Hormondiagnostik große praktische Bedeutung erlangt hat. Die morphologischen Grundlagen jedoch, auf denen die feineren Zusammenhänge und die Ursachen der Zytodynamik des Vaginalepithels verständlich zu machen wären, sind unvollständig. Dies bezieht sich ganz besonders auf licht- und elektronenmikroskopisch vergleichbare Untersuchungen.

Elektronenmikroskopische Studien am Vaginalepithel sind bisher lediglich von BAHR und MOBERGER (1956) durchgeführt worden. In neuerer Zeit berichten HAXSCHKE und SCHULZ (1960) über elektronenmikroskopische Befunde an Abstrichpräparaten von Vagina und Portio. BAHR und MOBERGER beschreiben die Feinstruktur der oberen Zellschichten des Vaginalepithels bei Frauen zwischen

* Aus dem Laboratorium des 2. Anatomischen Lehrstuhles (Prof. Dr. G. PETRY).

** Herrn Prof. Dr. med. et phil. H. BECHER zum 65. Geburtstag.

*** Mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

dem 12. und 13. Zyklustag und vertreten noch die Ansicht, daß die einzelnen Epithelzellen durch ein kontinuierliches interzelluläres Tonofibrillennetz synzytial verbunden seien. Die Abstoßung der oberflächlichen Zellen in Form elektronenmikroskopisch strukturloser Epithelplatten, die stellenweise noch eine intrazelluläre Faserstruktur erkennen lassen, soll durch einen enzymatischen Prozeß zustande kommen.

Die Feinstruktur des Portioepithels ist vorwiegend in seiner Beziehung zur Carcinogenese untersucht worden (ALBERTINI, GLATTHAAR und VOGEL 1954 u. 1955, GLATTHAAR und VOGEL 1958, BERGER, NEIDITSCH und MUMPRECHT 1958).

In der vorliegenden und den folgenden Mitteilungen soll über elektronenmikroskopische Untersuchungen am Vaginalepithel in den einzelnen Phasen des Zyklus, in der Schwangerschaft und in der Menopause berichtet werden. Die vielfältigen, nur auf Grund von Reihenuntersuchungen überblickbaren Beeinflussungsmöglichkeiten des Epithels während des Zyklus und des nicht mehr unter voller Funktion stehenden Vaginalepithels in der Menopause veranlaßten uns, zunächst die Untersuchungen am Vaginalepithel in der Schwangerschaft zu beginnen, das in diesem Zeitraum nur einer verhältnismäßig gleichförmigen Stimulierung unterliegt. Nach Eintritt einer Gravidität hören die zyklischen Veränderungen am Vaginalepithel auf.

STIEVE (1925) kam zu dem Ergebnis, daß das Scheidenepithel bereits in den ersten Monaten der Gravidität eine erhebliche Dickenzunahme erfährt und diese in zunehmendem Maße fortschreitet. Die Verdickung des Epithels soll aber weniger auf einer vermehrten Proliferation basaler Zellen beruhen, als vorwiegend auf einer Hypertrophie des gesamten Zellverbandes. Hierbei stehe besonders die Volumenvermehrung der einzelnen Epithelien der Stachelzellschicht im Vordergrund, die sowohl eine zunehmende Vergrößerung ihres Zelleibes als auch ihrer Kerne aufweise. Die am stärksten ausgeprägte Zellvergrößerung fand STIEVE bei einer Frau, die im 8. Schwangerschaftsmonat stand. Seine Befunde sind in der Folgezeit durch karyometrische Untersuchungen bestätigt worden.

Somit erscheint das *Vaginalepithel am Ende der Schwangerschaft* besonders geeignet für spezielle Untersuchungen über die Zytoarchitektonik des Epithelverbandes und über den Zellstrom von der Basis zur Oberfläche.

Material und Methodik¹

a) *Lichtmikroskopische Untersuchung.* Das Untersuchungsmaterial wurde durch Probeexzisionen aus der Vagina bei Frauen mit ungestörter Schwangerschaft im 8. und 9. Monat gewonnen. Es wurden ausschließlich Frauen untersucht, die zuvor nicht geboren hatten und bei denen entzündliche oder sonstige von der Norm abweichende Veränderungen in der Vagina und äußere Einflüsse ausgeschlossen werden konnten. Das Gewebe wurde jeweils an der gleichen Stelle, etwa an der Grenze zwischen oberem und mittlerem Drittel der hinteren Vaginalwand entnommen. Vor der Entnahme wurde außerdem aus dem oberen Drittel der Vagina „Vaginalsekret“ für elektronenmikroskopische Untersuchungen gewonnen; gleichzeitig wurden zytologische Abstriche angefertigt. Somit lagen vom gleichen Material sowohl lichtmikroskopisch als auch elektronenmikroskopisch direkt vergleichbare Präparate vor.

Fixierung: Neutrales Formalin und Fixierung nach ROSSMANN. Färbungen: HE, EH, Azan, Alzianblau-PAS-Reaktion mit und ohne Diastaseverdauung, Chromhämatoxylin-Phloxin nach GOMORI, Methylgrünpyronin, BTS-Reaktion nach SHIMIZU, Versilberungen nach GOMORI. Ferner wurden ungefärbte Schnitte sowie Vaginalabstriche in Cedax und in Glycerinwasser zu polarisationsoptischen Betrachtungen eingeschlossen.

¹ Frl. A. M. AHRENS, Frl. H. HEBELER und Frl. B. SCHÜLER danken wir für ihre verständnisvolle Mitarbeit bei der Präparation.

b) *Elektronenmikroskopische Untersuchung.* Fixierung etwa 1 mm³ großer Stücke in isotonischer, gepufferter OsO₄-Lösung (pH 7.2). Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Einbettung in Butyl-Methylmethacrylat-Gemisch (8:2). Herstellung der Schnitte mit

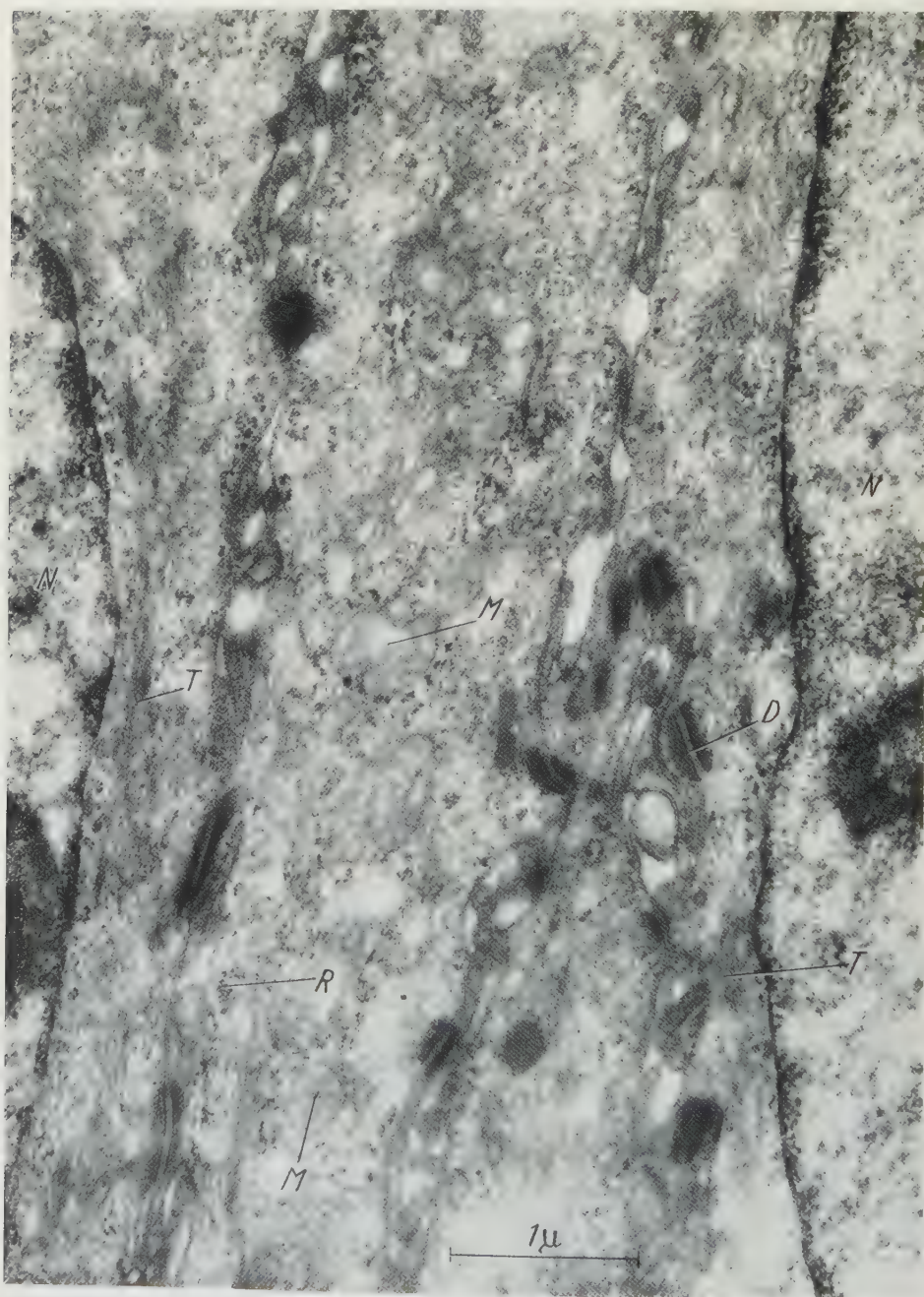


Abb. 1. Basale Zellschicht, verschiedene, durch Zellgrenzen voneinander getrennte Zellausschnitte.
 N Zellkern, M Mitochondrien, R Ribosomen, D Desmosomen, T Tonofilamente,
 Vergr. 25000fach

einem Porter-Blum-Mikrotom und einem Mikrotom mit thermischem Vorschub nach W. VOGELL. Die Schnitte wurden mit einem Siemens-Elektronenmikroskop (UM 100 b oder Elmiskop I bei 80 bzw. 60 KV) untersucht.

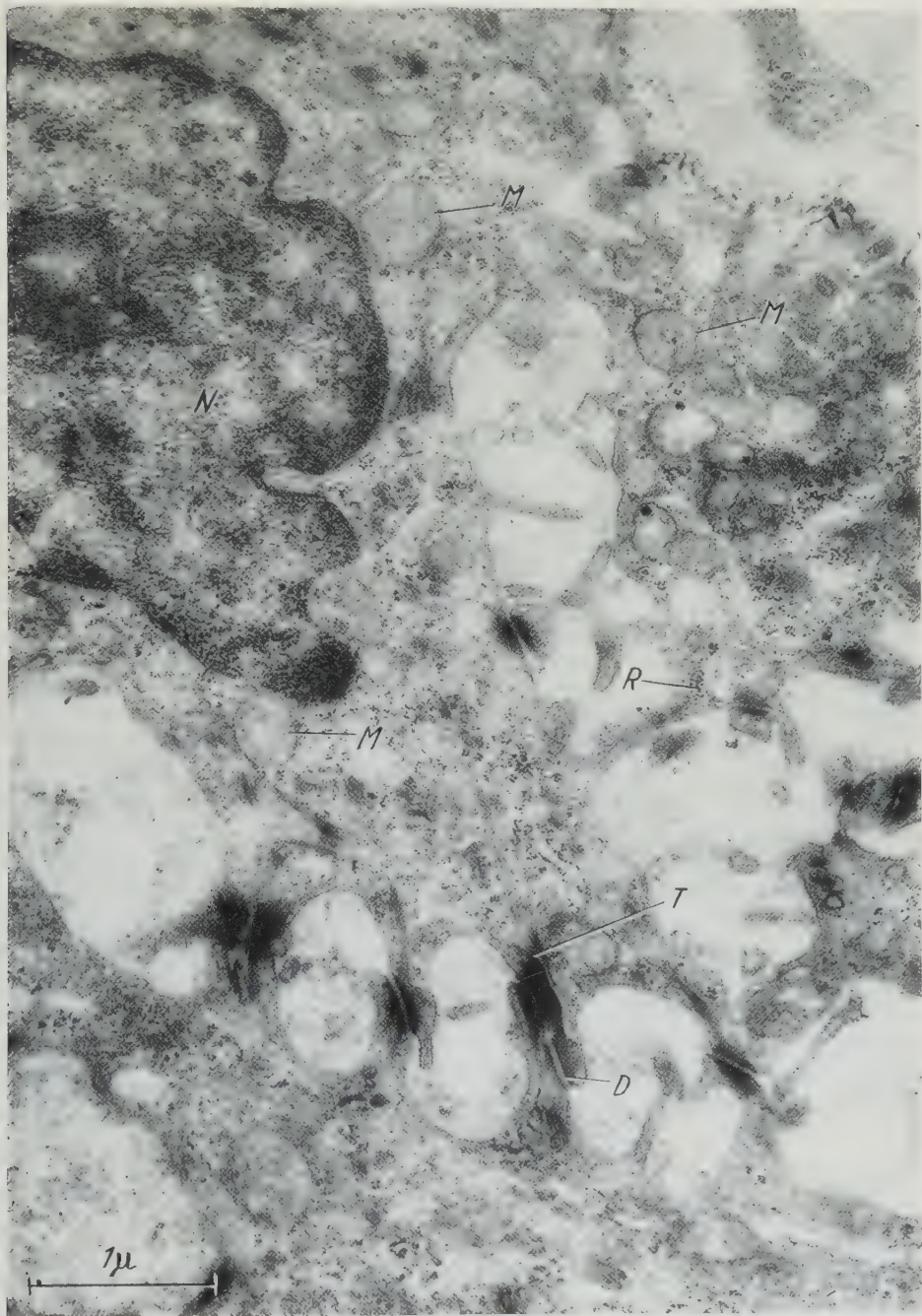


Abb. 2. Parabasale Schicht, verlängerte Interzellularbrücken mit zunehmender Schrägstellung der Kontaktflächen, Tonofilamentbündel. Erweiterte interzelluläre Räume (interdesmosomale Lakunen). Bezeichnung s. Abb. 1, Vergr. 25000fach

Befunde

Bei der Beschreibung der Befunde werden die Schichten des Vaginalepithels wie folgt unterschieden:

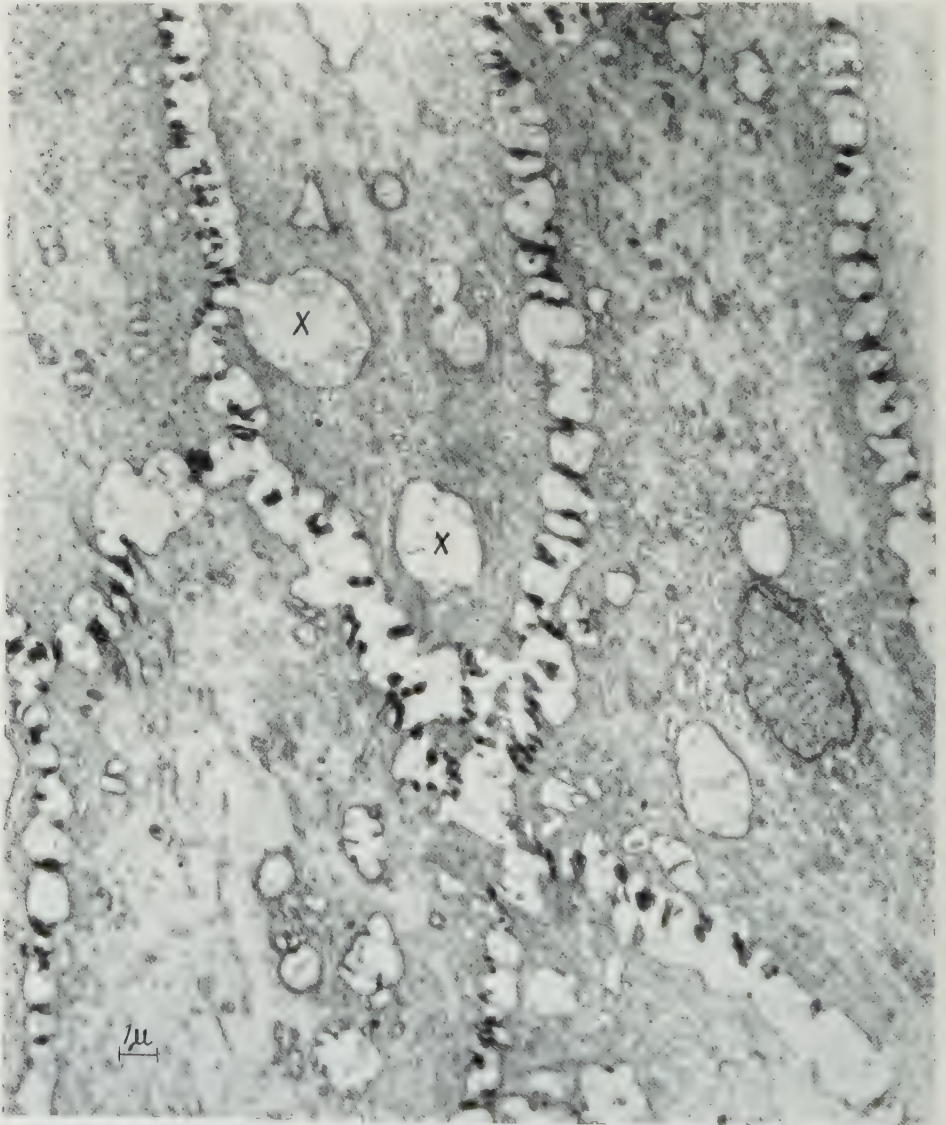


Abb. 3. Untere spongiöse Schicht, Übersicht. Die z. T. flach angeschnittenen vergrößerten interzellulären Räume täuschen intrazelluläre Vakuolen (X) vor. Beginnende intrazelluläre Aufhellungen. Vergr. 5000fach

1 basale Zellschicht, 2 parabasale Zellschicht, 3 untere Spongiosa, 4 obere Spongiosa, 5 Superficialschicht. In jeder der genannten Zellschichten werden besonders berücksichtigt: die Form der einzelnen Zellen, die Zahl und Form der Desmosomen, die interzellulären (interdesmosomalen) Räume, die Kernform und

die Dichte des Zytoplasmas, seine sonstige Beschaffenheit, das Vorkommen und die Beschaffenheit der Mitochondrien und schließlich Vorkommen, Verteilung und Verlauf der Tonofilamente bzw. Tonofibrillen.

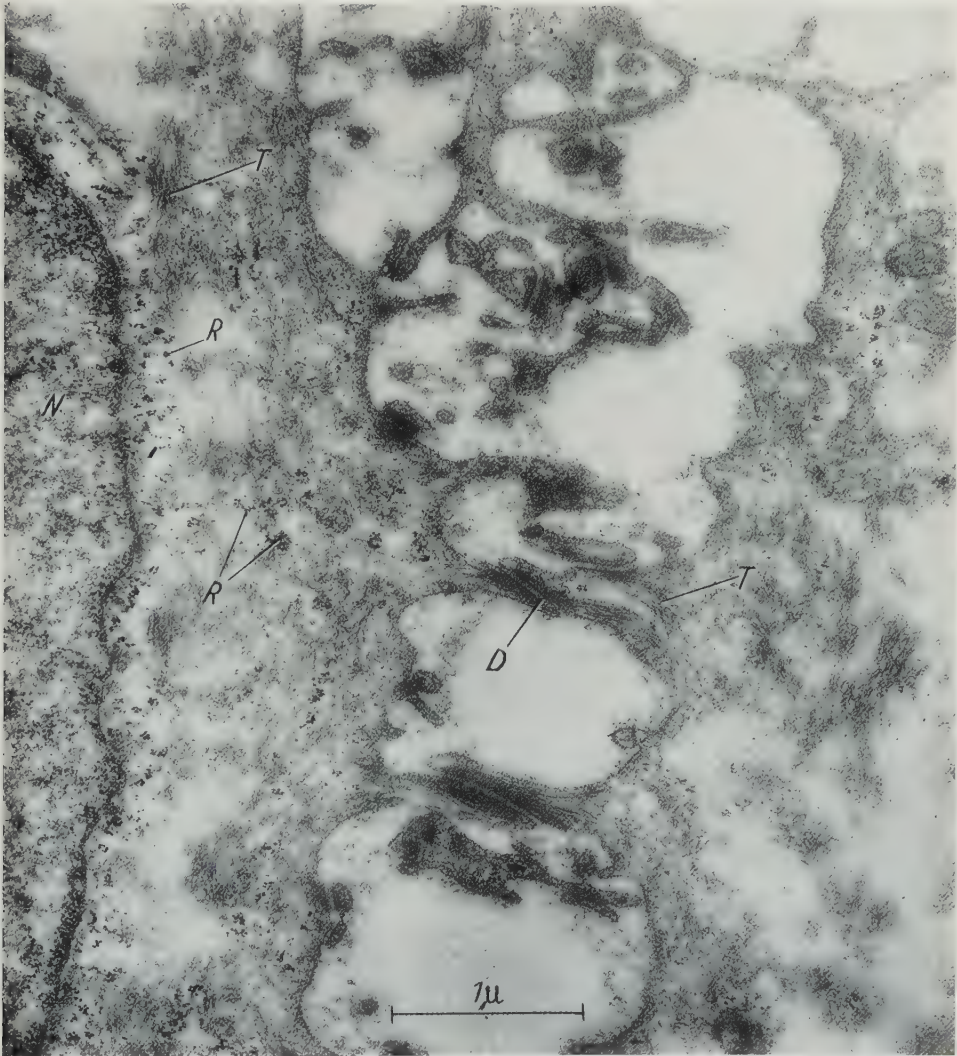


Abb. 4. Untere spongiöse Schicht. Maximale Erweiterung interzellulärer Räume und entsprechend lang gestreckte Interzellularbrücken mit schrägen Kontaktflächen und Tonofilamentbündeln. Vergr. 25 000fach

1. Die basale Zellschicht (Abb. 1, Schema Abb. 11/I). Die basale Zellschicht ist die Quelle für den Nachschub sich stets neu bildender Zellen, die ihren Weg zur Oberfläche nehmen. Diese Zellen sind im Vergleich zu allen anderen klein. Ihre Längsachsen stehen senkrecht zur Basis des Epithels. Glykogen ist in Spuren nachweisbar. Elektronenmikroskopisch zeigen die zum Teil gelappten, ovoiden Zellkerne ein feinstrukturiertes Karyoplasma mit zahlreichen Nucleoli. Tonofilamente sind vorwiegend im Perikaryon anzutreffen und parallel zur Zellober-

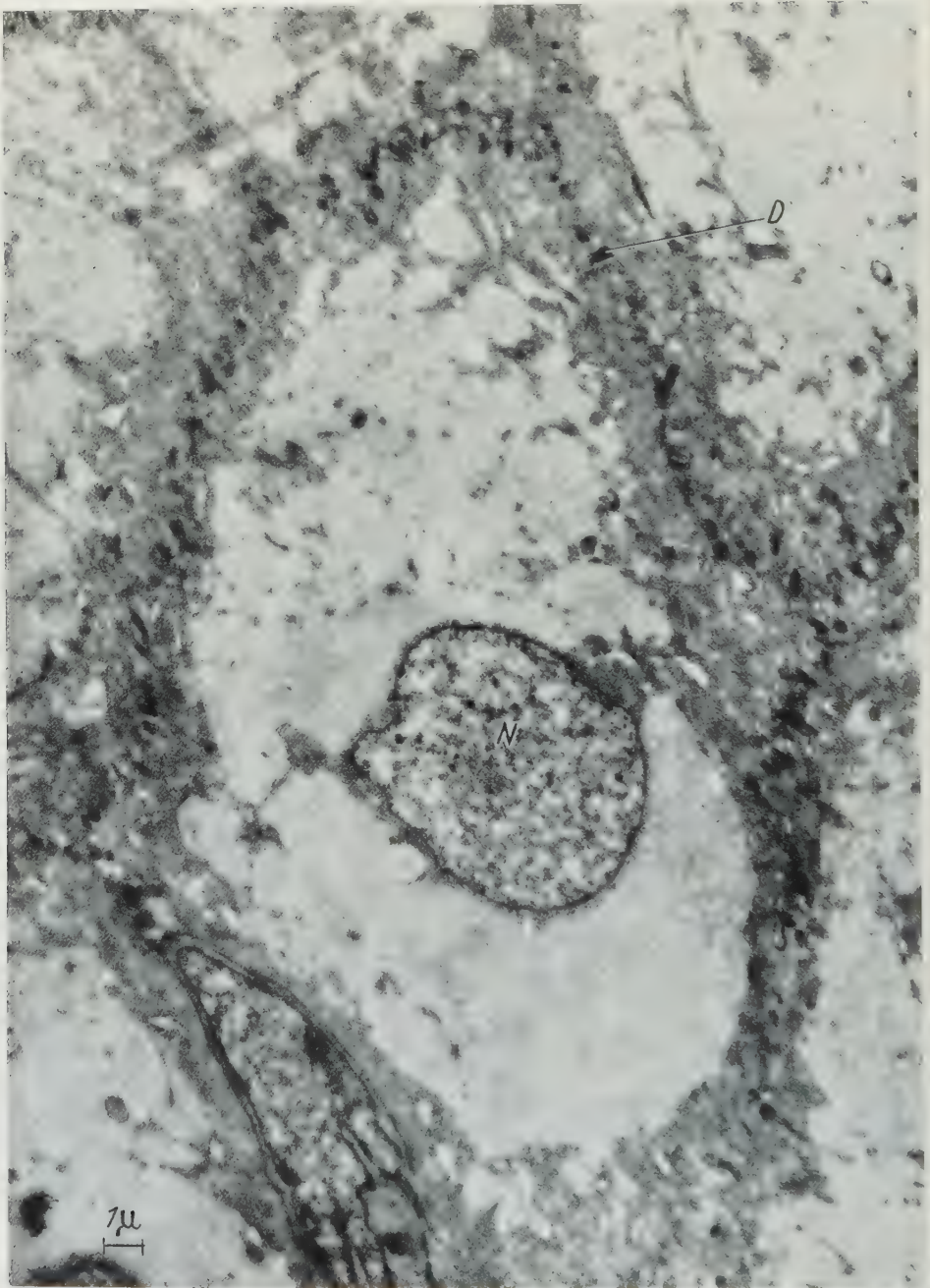


Abb. 5. Obere spongiöse Schicht, Übersichtsbild einer Zelle. Aufhellung des perinukleären Bereiches, Abdrängung dichter strukturierten Plasmas an die Zelloberfläche. Vergr. 5400fach

fläche ausgerichtet. Neben vereinzelten retikulären Strukturen findet man vor allem freie Ribosomen. Mitochondrien sind zahlreich vorhanden. Die Zellen sind durch verhältnismäßig kurze und schmale Interzellularbrücken verbunden, die

kaum Tonofilamente enthalten. Die Zellzwischenräume sind schmal, ihre Grenzen sind stark verzahnt.

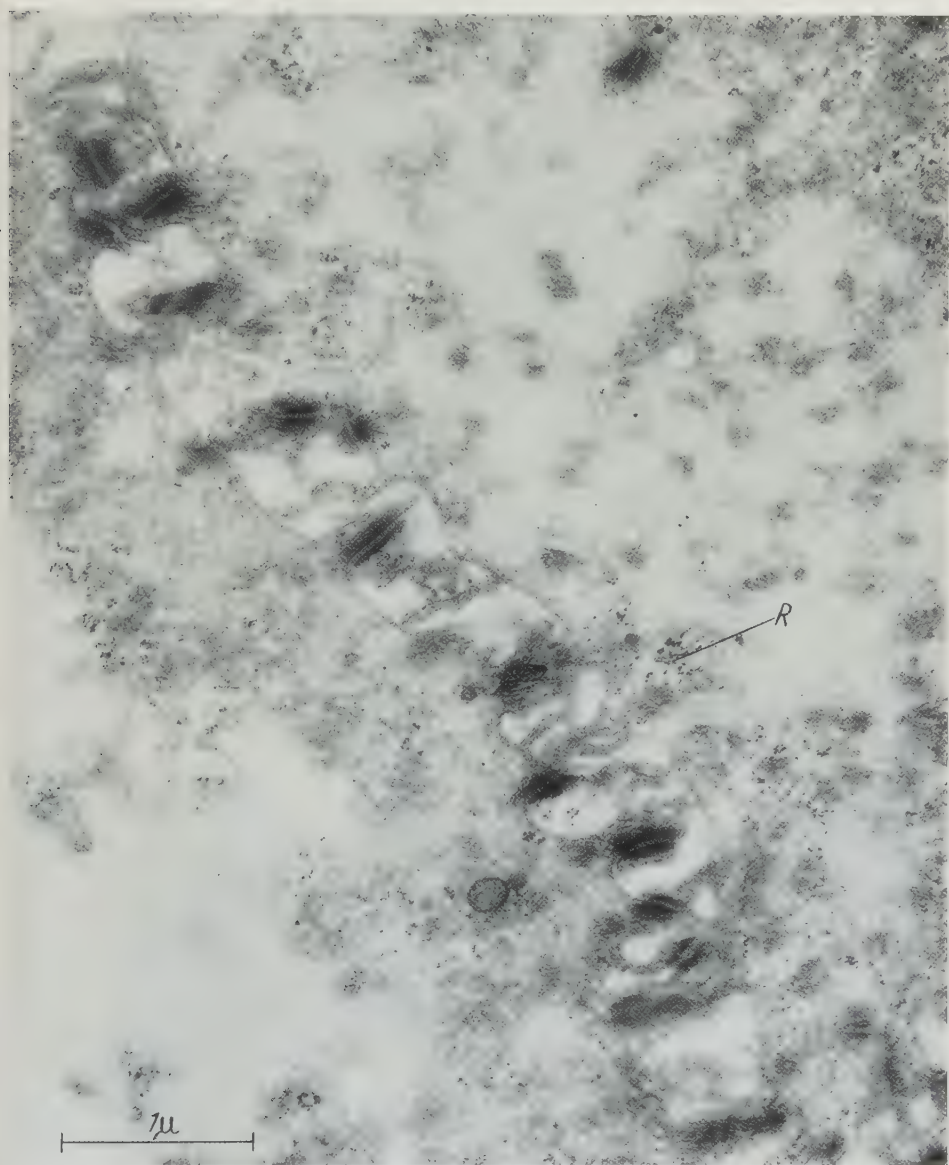


Abb. 6. Obere spongiöse Schicht. Auffallende Verkleinerung der interzellulären Räume, kurze Interzellularbrücken (vgl. Abb. 4 bei gleicher Vergrößerung!). Zunehmende Aufhellung des zentralen Zytoplasmas, Vergr. 25 000fach

2. Die parabasale Zellschicht (Abb. 2, Schema Abb. 11/2). Die durch mitotische Teilung aus den basalen Zellen hervorgegangenen parabasalen Zellen sind etwas größer als letztere und enthalten auch schon mehr Glykogenkörnchen. Ihre Kerne sind teils abgerundet, teils noch gelappt. Im Lichtmikroskop erkennt man

bereits deutliche Interzellularspalten. Elektronenmikroskopisch werden mehr Desmosomen festgestellt. Die Interzellularbrücken sind etwas länger und breiter. Mit ihrer Verlängerung tritt gleichzeitig eine zunehmende Schrägstellung der Kontaktflächen auf. Zahlreiche Tonofilamente strahlen nunmehr in die Interzellularbrücken ein. Die interzellulären Räume sind erweitert. Die Mitochondrien

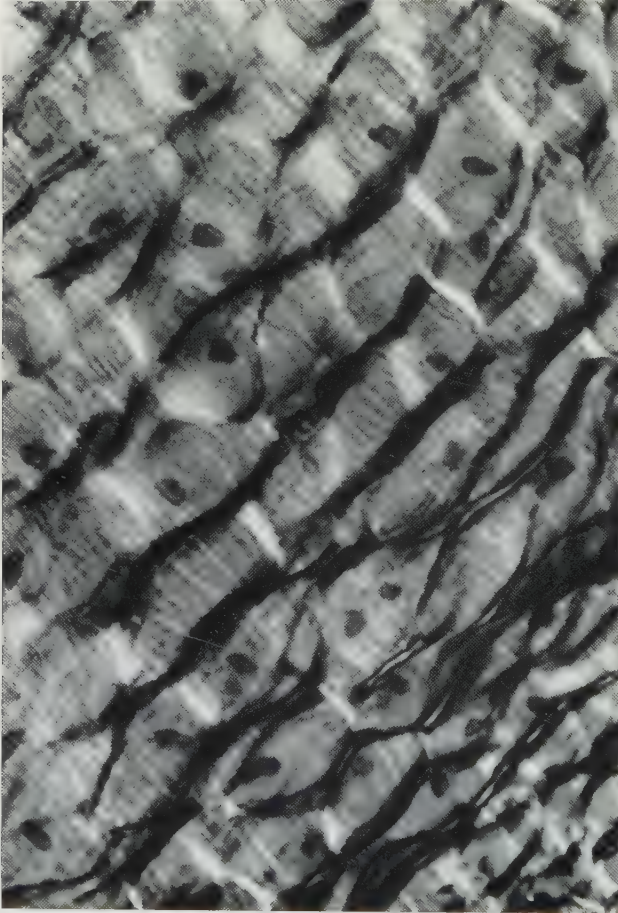


Abb. 7. Tonofilamentbündel in polarisiertem Licht. Untere bis obere spongiöse Schicht, Flachschnitt. Achsen der gekreuzten Nicols entsprechen den Bildrändern. Vergr. 560fach

lassen gelegentlich eine Quellung und Auflösung ihrer Innenstruktur (Cristae) erkennen.

3. Untere Spongiosa (Abb. 3, 4, Schema Abb. 11/3). Die untere Spongiosa entspricht den tieferen Zellagen der sog. Stachelschicht (Abb. 3). Mit der PAS-Reaktion läßt sich bereits eine massivere Ansammlung von Glykogen nachweisen, das noch unterschiedlich im Zytoplasma verteilt ist. Das elektronenmikroskopische Bild ist besonders durch eine auffallende Erweiterung der interzellulären Räume charakterisiert, wodurch die Interzellularbrücken noch länger und schmaler werden als in der parabasalen Schicht (Abb. 4). Ihre Kontaktflächen liegen fast in der Längsachse der Brücken, so daß man den Eindruck gewinnt, als ob die jeweiligen Brücken-

anteile in der Längsrichtung aneinander entlanggleiten oder vorbeigezogen würden. Das Perikaryon enthält verschieden große aufgelockerte Bezirke, die mit der beginnenden Ablagerung von Glykogen übereinstimmen. Die Randzonen der Zellen sowie schmale perinukleäre Bezirke sind dichter strukturiert und enthalten freie Ribosomen. Die Zahl der Mitochondrien ist geringgradig vermindert. Sie zeigen jedoch vorwiegend verwaschene Innenstrukturen. Die Tonofilamente sind vor allem im randständigen Zytoplasma angesammelt und strahlen als dichte parallel gerichtete Bündel in die Interzellularbrücken ein. Die Kerne sind im allgemeinen rund. Ihr Chromatin ist gleichmäßig verteilt, jedoch grobkörniger.

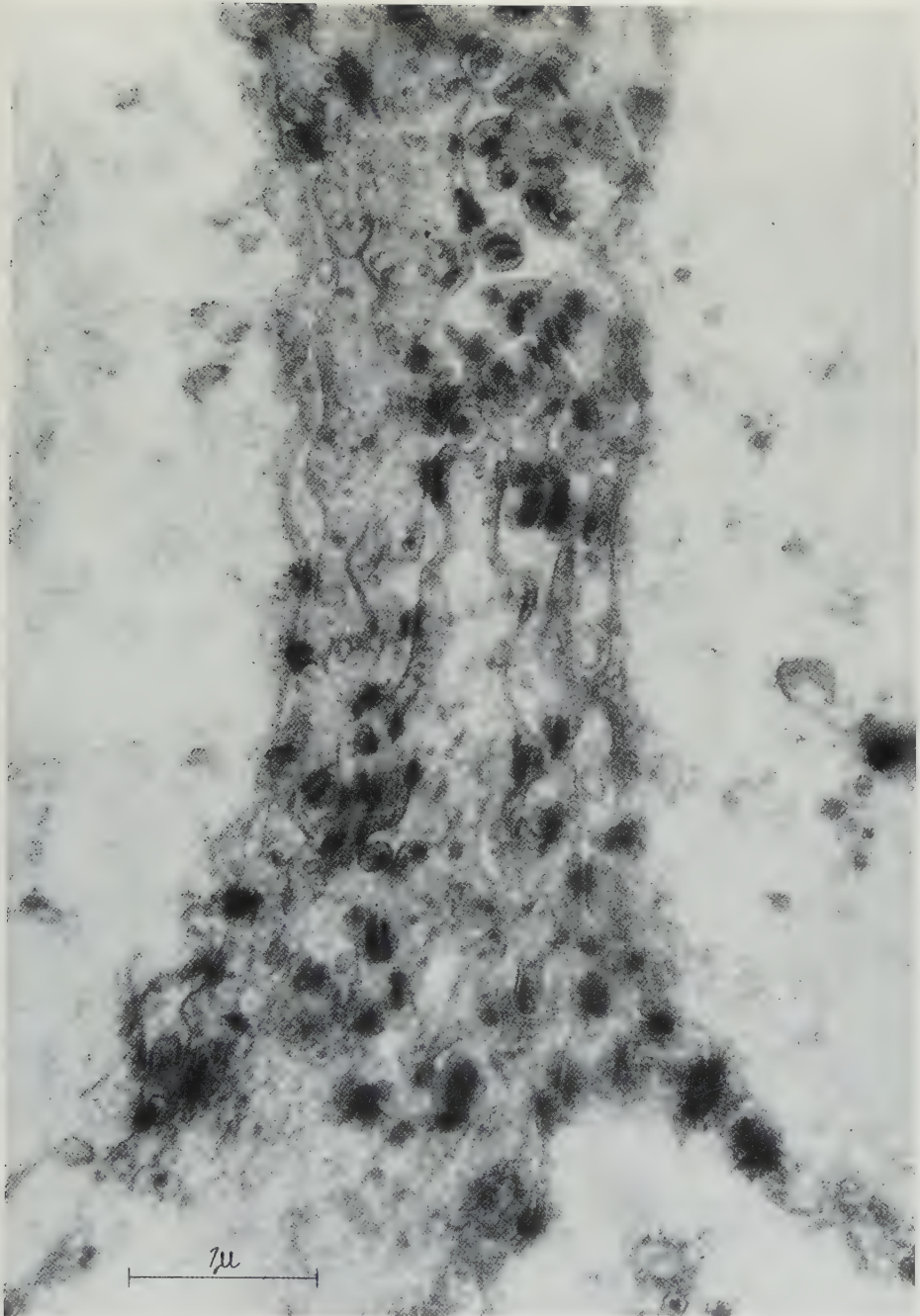


Abb. 8. Superfizielle Schicht, verzahnte Zellgrenzen, dicht stehende, stark vermehrte Interzellularbrücken mit kurzen, z.T. veränderten Kontaktflächen. Interzellularräume zu schmalen Spalten reduziert. Vergr. 25000fach

4. Obere Spongiosa (Abb. 5, 6, 7, Schema Abb. 11/4). Das wesentlichste Merkmal der oberen spongiösen Schicht ist die fast vollständige Abdrängung des

dicke strukturierten Zytoplasmaanteiles in die Randzonen der Zellen (Abb. 5). Das Zellinnere ist elektronenoptisch vorwiegend leer. Die Kerne sind weniger dicht strukturiert. Mitochondrien finden sich noch vereinzelt in den dichten Randzonen. Die Kernoberfläche wird von einem dünnen Saum dichter strukturierten Plasmas umgeben. Tonofibrillen sind nur in der Peripherie der Zellen



Abb. 9. Superfiziale Schicht, Übersicht sich ablösender Zellen. Zwischen den Zellen Anschnitte von Bakterien. Vergr. 5000fach

vorhanden. Die Tonofilamentbündel sind aufgelockert. Die im Querschnitt stark abgeflachten Zellen nehmen an Volumen zu. Diese Volumenzunahme geht mit einer entsprechenden Verkleinerung der vorher weiten interdesmosomalen Räume einher (Abb. 6), wodurch die Zelloberflächen näher aneinander rücken. Die Interzellularbrücken werden gegenüber denen der unteren spongiösen Schicht auffallend kürzer (vgl. Abb. 3, 5). Gleichzeitig vermehrt sich erneut die Zahl der Desmosomen, deren Kontaktflächen nicht mehr tangential stehen, sondern wieder die ursprüngliche schräge und schließlich gerade Stellung einnehmen. Damit tritt eine zunehmende „Verzahnung“ des Epithelverbandes auf. Es besteht demnach

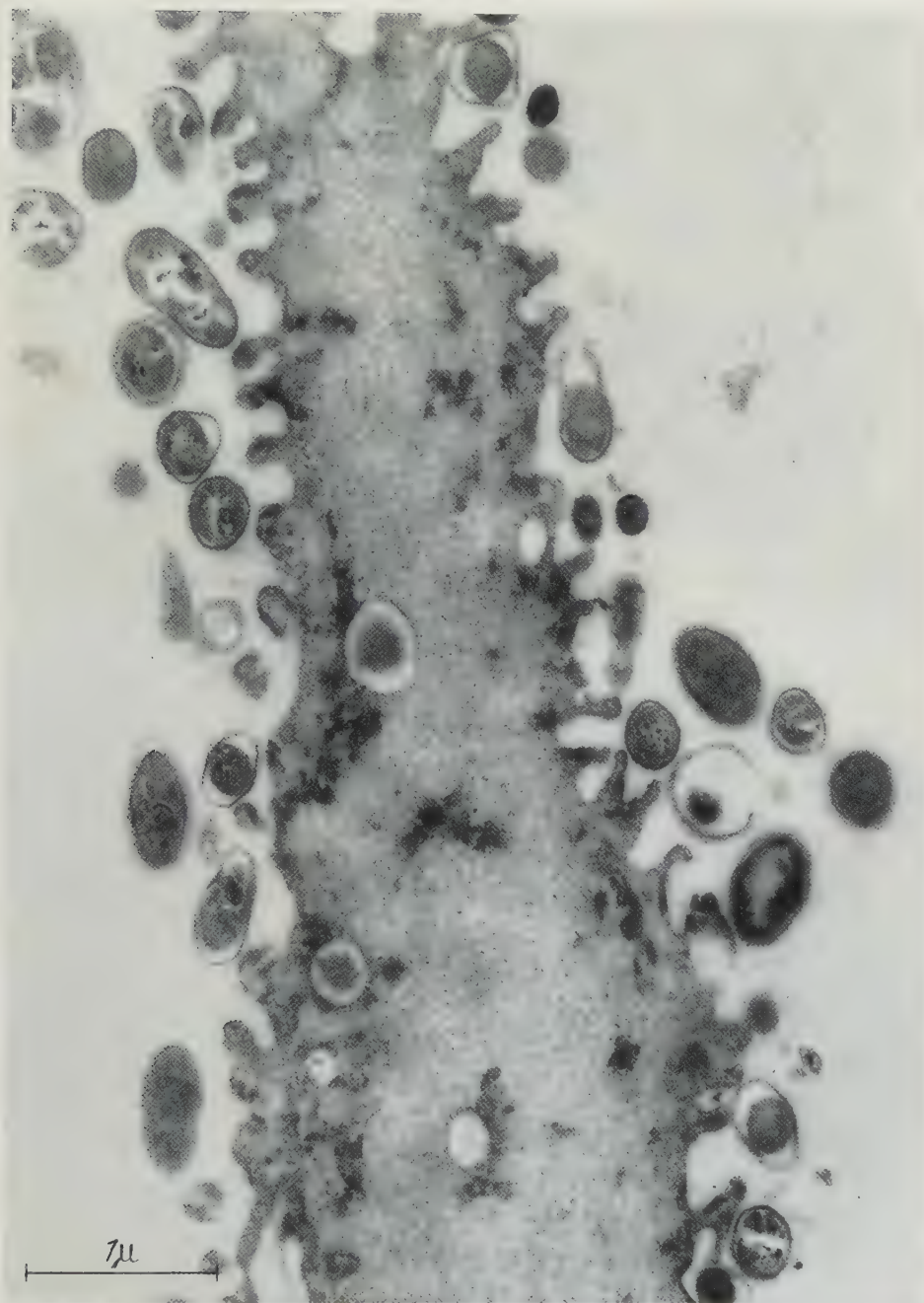


Abb. 10. Superfizielle Schicht. Anschnitt einer abgelösten Zelle, kurze abgerundete Protoplasma-
vorstülpungen sind Reste der gelösten Interzellularverbindungen. Homogen strukturiertes Zellinneres,
zahlreiche Bakterienanschnitte. Vergr. 25000fach

ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Zellgröße und der Weite interzellulärer
Räume, sowie zwischen der Länge der Interzellularbrücken und ihrer Zahl.

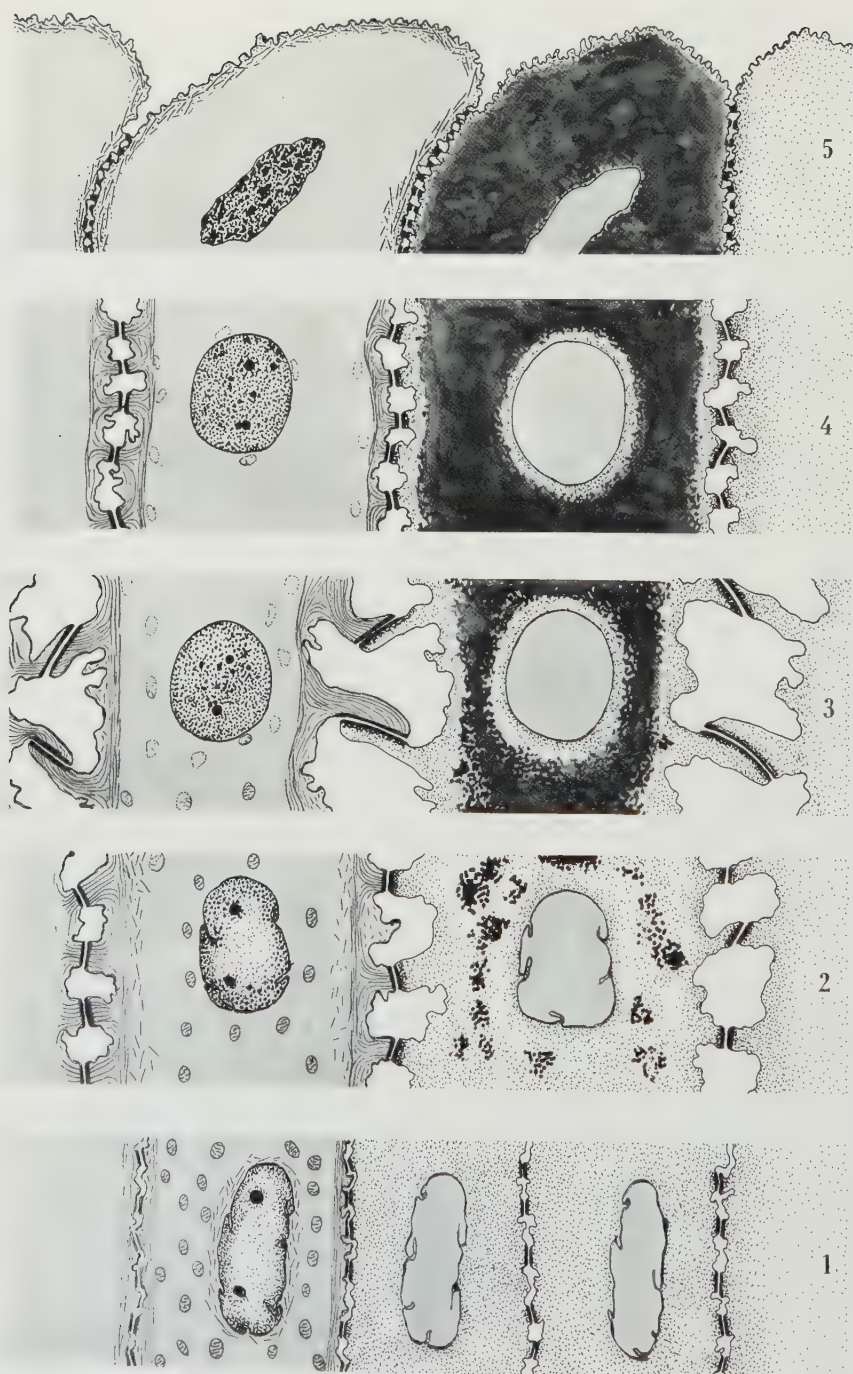


Abb. 11. Schematische Darstellung und Gegenüberstellung der wesentlichen Befunde innerhalb der Zellschichten 1—5. Basale Zellen (1, unten), Superfizialschicht (5, oben). Innerhalb der einzelnen Rubriken 1—5 sind von rechts nach links schematisch eingetragen: Desmosomen und interdesmosomale Räume, Glykogenspeicherung (schwarz), Kernformen und Mitochondrien sowie Tonofibrillenarrangements, s. Text (gez. PETRY)

Elektronenoptisch leere Zellräume entsprechen wieder den bei lichtmikroskopischer Betrachtung häufig als homogene Massen erkennbaren Ablagerungen von *Glykogen*. Im polarisierten Licht erscheinen die doppelbrechenden Tonofibrillen als ringförmige, quer zur Längsachse der Zellen unmittelbar unter der Oberfläche verlaufende Bänder (Abb. 7). Ihre Querschnitte treten als punktförmige Unterbrechungen der Interzellularräume im lichtmikroskopischen Bild auf. Da die Richtung dieser ringförmig angeordneten Tonofibrillen in über- und nebeneinander liegenden Zellen kleinerer Gewebsareale weitgehend gleich ist, entsteht dadurch das Bild eines durchlaufenden Tonofibrillensystems innerhalb des gesamten Epithelverbandes.

5. Superfiziale Schicht (Abb. 8, 9, 10, Schema Abb. 11/5). Die oberflächlichen Zellagen, die zur Abstoßung bereit sind, zeichnen sich im elektronenmikroskopischen Bild vor allem durch die rapide Zunahme dicht stehender Interzellularbrücken aus, deren Zahl das Vielfache der der unteren Schichten beträgt (Abb. 8). Die einzelnen Brücken sind sehr kurz, ihre Kontaktflächen auffallend schmal. Nur ein Teil der Desmosomen zeigt noch die typische Struktur. Die im Aufsichtsbild großflächigen, im Querschnitt schmalen Zellen sind strukturarm. Ihre Kerne sind pyknotisch. Fast das gesamte Zellinnere ist — entsprechend der hochgradigen Glykogenablagerung — elektronenoptisch leer. Die sehr schmale und scharf abgesetzte Randzone dichter strukturierten Plasmas enthält nur noch Tonofilamente. Die Interzellularräume der noch im Verband befindlichen Epithelien sind auffallend eng. Bei Zellen, die sich voneinander lösen (Abb. 9 und 10), werden die Zytoplasmafortsätze der ehemaligen Interzellularbrücken unter Abrundung zurückgezogen. Auch wenn sich solche Fortsätze noch berühren, ist der typische Aufbau der Desmosomen nur noch in wenigen Fällen vorhanden. Das Innere dieser sich ablösenden Zellen erscheint wieder homogener und elektronenoptisch dichter, vermutlich infolge ihrer zunehmenden Austrocknung.

Diskussion

Die Unterbrechung zyklischer Veränderungen in der Schwangerschaft veranlaßte uns, die Untersuchungen über den morphologischen Wandel des Vaginalepithels auf seinem Wege von der Basis zur Oberfläche bei der Schwangeren zu beginnen. Über die Befunde am zyklisch veränderten und in der Menopause atrophischen Vaginalepithel wird später berichtet werden.

Die Besonderheiten des Vaginalepithels lassen sich am besten durch seine Funktion charakterisieren. Einmal ist es ebenso wie das Mundschleimhaut- oder Oesophagusepithel äußeren Einflüssen ausgesetzt; diese sind vorwiegend mechanischer Natur. Hieraus ergibt sich wie bei allen mehrschichtigen Epithelien die Notwendigkeit einer laufenden Erneuerung der sich ablösenden oberflächlichen Zellen. Der Zellnachschub erfolgt von der Basis aus. Zum anderen wird durch die bakteriell bedingte Umwandlung des Glykogens der oberen Vaginalzellen ein anscheinend biologisch unabdingbares saures Milieu erzeugt, das wiederum durch eine kontinuierliche Abstoßung glykogenhaltiger Epithelien erreicht werden kann. Demnach ist bei der Beurteilung des morphologischen Bildes in den einzelnen Epithelschichten der fortwährend oberflächenwärts gerichtete Strom von Zellen und somit ein dauernder Materialtransport von Zellinhalt zu beachten. Hierbei steht die Glykogensynthese im Vordergrund. Darüber hinaus findet mit

diesem Zellstrom zweifellos auch ein zur Oberfläche des Epithels gerichteter Transport interzellulär befindlichen Materials statt. Das durch die Gesamtheit der interzellulären Spalträume im Epithelverband gebildete Raumsystem steht offenbar vorwiegend im Dienste des Flüssigkeitsaustausches und der Osmoregulation. Wahrscheinlich ist dieses Hohlraumsystem auch für den Feuchtigkeitsgehalt und die Transsudation der Vaginalschleimhaut von Bedeutung.

Andererseits ist auch eine Beeinflussung des Vaginalepithels von der Oberfläche her durch die auffälligen pH -Unterschiede zwischen Vaginallumen und den Basalepithellagen anzunehmen. Während man im Vaginal„sekret“ in der Geschlechtsreife ein pH von 4,5—5,5 findet und der Wert in der Schwangerschaft sogar noch niedriger liegt (MÜLLER 1960), ist er im subepithelialen Bindegewebe etwa 7,4. Innerhalb der Epithelwand besteht daher ein Gefälle der Wasserstoffionenkonzentration.

Es ergibt sich hieraus die Frage, inwieweit die vielfältigen funktionellen Beanspruchungen morphologisch erfaßbar sind. Im Vordergrund stehen dabei elektronenmikroskopische Betrachtungen. Über zytologische und lichtmikroskopische Untersuchungen am Vaginalepithel liegen eine Reihe gründlicher Arbeiten vor (Lit. bei PAPANICOLAOU und TRAUTZ 1948, SMOLKA und SOOST 1956, ZINSER 1957). Sie entbanden uns jedoch nicht von den entsprechenden Kontrollen am eigenen Material. Erst hierdurch konnten exakte Vergleiche mit elektronenmikroskopischen Befunden angestellt werden.

Die zu besprechenden Befunde am Vaginalepithel in der Schwangerschaft sind im Schema der Abb. 11 synoptisch dargestellt.

Wachstum und Zellvermehrung in den unteren beiden Zellagen setzen eine hohe Stoffwechselaktivität voraus. Die Kerne dieser Zellen sind relativ groß, gelappt und chromatinreich, ihre Chromatinsubstanz ist gleichmäßig verteilt. Parallel zur Stoffwechselaktivität zeigen die Mitochondrien in der basalen und parabasalen Zellschicht die reguläre Gestalt, während sie in den Schichten 3 und 4 — soweit sie überhaupt noch vorhanden sind — bereits deutliche regressive Veränderungen in Form von Quellung und Auflösung ihrer typischen Innenstruktur erkennen lassen. Entsprechend der lichtmikroskopisch nachweisbaren Basophilie finden sich in den tieferen Zellschichten gleichmäßig verteilte Ribosomen, die mit der Proteinsynthese in Zusammenhang gebracht werden (PALADE und SIEKEVITZ 1955).

Die in den mittleren und oberen Zellschichten lichtmikroskopisch von der unteren Spongiosa an in immer größerer Menge nachweisbaren Glykogenablagerungen finden elektronenmikroskopisch ihr Äquivalent in zunehmenden Aufhellungen des Perikaryons. Mit steigendem Glykogengehalt wird das elektronenmikroskopisch dichter strukturierte Plasma gegen die Zelloberfläche verdrängt. In der oberen Spongiosa und Superficialzone führt dies zum Auftreten elektronenoptisch leerer Plasmaräume. Das morphologische Bild zeigt demnach, daß das Maximum der Stoffwechselaktivität an die beiden basalen Zellschichten gebunden sein muß, während die maximale Speicherleistung des Glykogens in der unteren und oberen spongiosen Schicht erfolgt.

Der Formwandel der Zellen von der Basis bis zu den stark abgeplatteten oberflächlichen Lagen, sowie die Diskrepanz der Zellzahl pro Streckeneinheit

zwischen Basis und Oberfläche führen zwangsläufig zu gegenseitigen *Verschiebungen* benachbarter Zellen. Hierbei müssen interzelluläre Verbindungen gelöst und neue wieder gebildet werden.

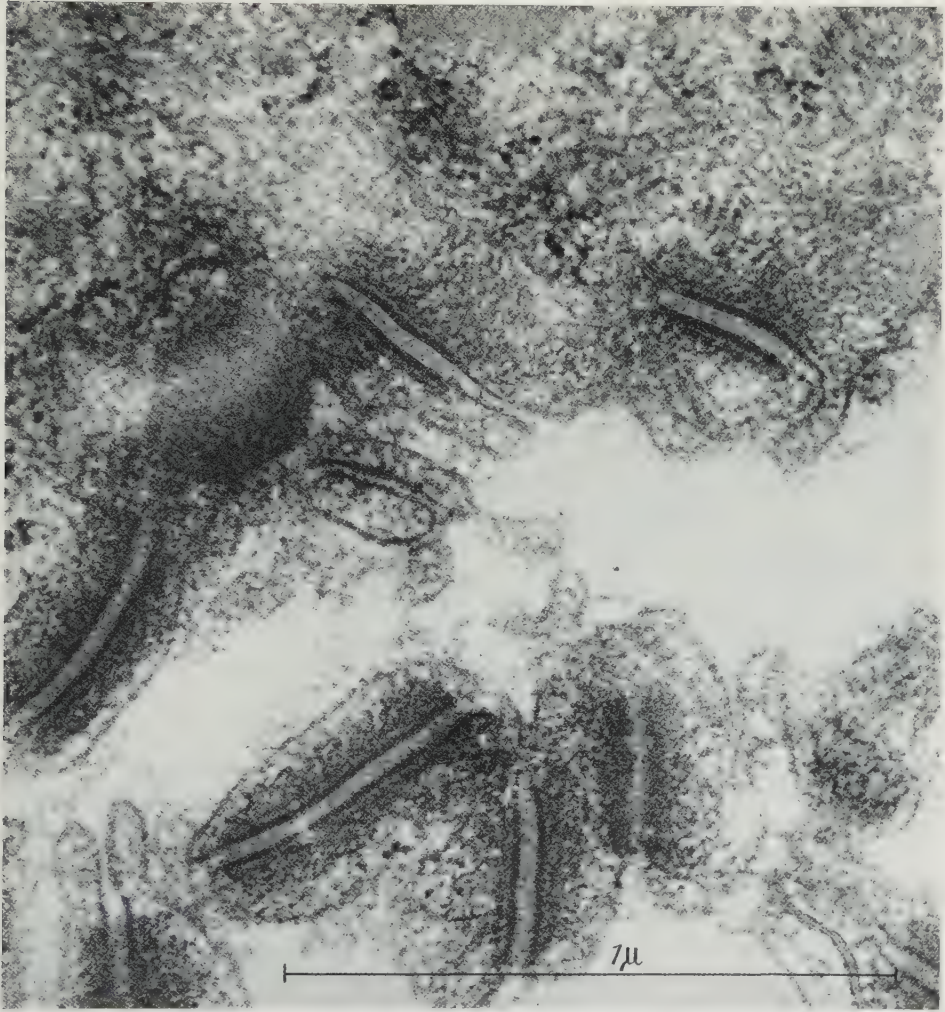


Abb. 12. Interzellularbrücken mit Desmosomen, untere spongiöse Schicht. Im Bauprinzip vergleichbar mit den Befunden von A. VOGEL (1960). Vergr. 80 000fach

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der letzten Jahre haben den Bau der interzellulären Verbindungen in mehrschichtigen Plattenepithelien im wesentlichen klargestellt (PORTER 1954, SELBY 1956, HORSTMANN 1957, HORSTMANN u. KNOOP 1958, ODLAND 1958 und A. VOGEL 1958). Diese Untersuchungen bezogen sich vorwiegend auf den Bau der Brücken als solche und weniger oder überhaupt nicht auf ihre Besonderheiten in den einzelnen Zellagen.

Die Verbindung zweier Zellen läßt sich heute wie folgt definieren (Abb. 12): Kurze oder längere Protoplasmavorstülpungen zweier benachbarter Zellen berühren sich in einer geraden oder schrägen Fläche (Interzellularbrücken). Eine weder zur einen noch zur anderen Zelle

gehörige Mittelschicht (Interzellularfuge), die vermutlich aus orientierten Molekülketten aufgebaut ist, bildet die Kontaktfläche. In diese als Desmosomen bezeichneten Verbindungsstellen strahlen Tonofilamente der jeweiligen Zellen ein. Direkte Übergänge der Tonofilamente von einer Zelle zur anderen bestehen entgegen älteren Lehrmeinungen nicht. Zwischen den Desmosomen befinden sich interzelluläre Räume (interdesmosomale Lakunen), deren Größe und Zahl ebenfalls sehr unterschiedlich ist.

Aus den oben angedeuteten Gründen lassen Epithelien, die einem Wandlungsprozeß unterliegen, auch Formänderungen der interzellulären Verbindungen erwarten. Unsere Befunde am Vaginalepithel, über die schon kurz berichtet wurde (PETRY, OVERBECK und W. VOGELL 1961) zeigen, daß während des Wachstumsschubes von der Basis bis zur Oberfläche z. T. *erhebliche Unterschiede in der Gestalt und Zahl der Interzellularbrücken* auftreten. Beim Hochrücken der basalen Zellen in die Parabasalschicht vermehrt sich zunächst die Zahl der Interzellularbrücken. Sie scheinen in der unteren Spongiosa wieder abzunehmen und nehmen in der oberen Spongiosa wieder zu und sind ganz besonders zahlreich und klein in der oberen Superfizialschicht. Gleichzeitig (s. Abb. 5, Schema Abb. 11, 13) ändert sich hierbei auch die Gestalt der Desmosomen, die einmal mehr frontale, dann wieder tangentiale Stellung einnehmen. Um dieses Phänomen erklären zu können, muß man annehmen, daß die Desmosomen sich lösen, wenn zwei Zellflächen beim Wachstumsschub aneinander vorbeigleiten. Da andererseits die Desmosomenzahl gegen die Oberfläche wieder stark vermehrt wird, müssen sie sich auch wieder neu bilden können. Dies bedeutet, daß Desmosomen keine bleibenden Kontakte, sondern *temporäre Gebilde* sind. Dies gilt nicht nur für das Vaginalepithel, sondern für alle mehrschichtigen Plattenepithelien.

Zwangsläufig ergibt sich das gleiche für die Zahl und Anordnung der Tonofilamente. Sie stellen ebenfalls wandelbare, metaplasmathe Elemente dar, deren Auftreten von den jeweiligen Spannungen innerhalb der Zelle abhängig sein muß. Da benachbarte Zellen gleichen Bedingungen ausgesetzt sind, orientieren sich die intrazellulär begrenzten Tonofilamente entsprechend dem innerhalb des gesamten Zellverbandes herrschenden Spannungszustand. Ihre Anordnung ergibt die seit langem bekannten trajektoriiellen Systeme. Da diese im Gesamtverband gleich bleiben, die Zellen aber gleichzeitig zur Oberfläche wandern, muß auch die Ausrichtung der intrazellulären Tonofilamente einem dauernden Wechsel unterworfen sein. Innerhalb der einzelnen Zelle sind besonders in Schicht 3 und 4 die Tonofilamente zu Bündeln zusammengefaßt, die zirkulär unter der Zelloberfläche angeordnet sind und jeweils in die Interzellularbrücken einstrahlen (Schema Abb. 13).

Die Wandelbarkeit der Tonofilamente wirft ein Licht auf ihre Entstehung: Die Menge elektronenmikroskopisch sichtbarer Tonofilamente entspricht dem Ausmaß polarisationsoptisch nachweisbarer Doppelbrechung. Dies ist die Folge einer Richtungsorientierung (anisotrope Anordnung) von Strukturen bzw. Strukturelementen (Molekülketten). Somit muß das Auftreten von Tonofilamenten als der Ausdruck einer Orientierung infolge von Spannungen gedeutet werden. Entsprechend treten in den stark ausgezogenen Interzellularbrücken der Schichten 3 und 4 die Tonofilamente nach Zahl und Orientierung am eindrucksvollsten auf.

Die Ablösung der Superfizialschicht aus dem Epithelverband geht mit einer Veränderung der Interzellularbrücken einher. Die Trennung der kurzen und sehr zahlreichen Desmosomen (s. Abb. 9—11) und damit der Ablösungsprozeß der

Zellen steht offensichtlich mit einer Veränderung der Kontaktzonen in Zusammenhang. Hierbei runden sich die Zellfortsätze ab, sie werden gewissermaßen eingezogen. Hinsichtlich der Zellabstoßung des Mundschleimhautepithels nehmen FASKE und THEMANN (1959) an, daß sich innerhalb der Kontaktzone eine Kittsubstanz befindet, die Hyaluronsäure enthält und deren Auflösung durch Hyaluronidase die Abstoßung der oberflächlichen Epithelzellen bewirken soll. Es ist

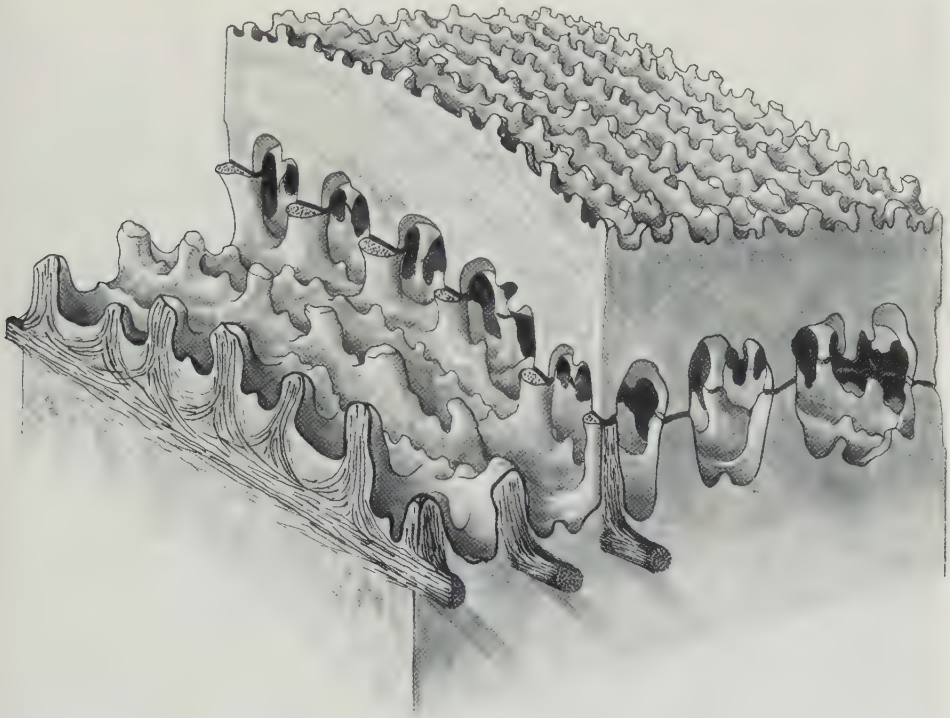


Abb. 13. Schematische Darstellung von Oberflächen zweier benachbarter Zellausschnitte. Leistenartige Erhebungen, Nebenleisten; innerhalb der großen Fortsätze Verbindungen mit denen benachbarter Zellflächen zu Interzellularbrücken. Dazwischen interdesmosomale Räume. Oben Darstellung der Leisten und Erhebungen entsprechend den Befunden in der Superfizialschicht. Einstrahlen von Tonofilamentbündeln in die Interzellularbrücken (gez. PETRY)

denkbar, daß auch im Vaginalepithel der Ablösungsprozeß in ähnlicher Weise fermentativ erfolgt. Da es jedoch bei prolabierte Abschnitten der Vaginalschleimhaut zu einer Austrocknung und zu Veränderungen im Sinne einer echten Keratinisierung kommt, scheinen sowohl die normale Feuchtigkeit als auch das saure pH in der Vagina für den Ablösungsprozeß eine wesentliche Rolle zu spielen.

In Übereinstimmung mit den funktionellen Gegebenheiten lassen die morphologischen Befunde ein biologisches Wirkungsprinzip in der Vagina erkennen, das durch folgende Teilfaktoren gekennzeichnet werden kann:

1. Die Bereitstellung von Glykogen in den abzustoßenden Epithelien.
2. Beeinflussung der Glykogensynthese durch den Follikelhormonspiegel.
3. Abbau des Glykogens vorwiegend in Form einer bakteriellen Glykolyse, wobei jedoch nach den Untersuchungen am Vaginal„sekret“ Neugeborener in den

ersten 12 Lebensstunden (KESSLER und RÖHRS 1927) offenbar auch eine abakterielle Glykolyse prinzipiell erfolgen kann.

4. Anwesenheit der Döderleinschen Scheidenflora.

Das Zusammenwirken aller Faktoren ist die Voraussetzung zur Aufrechterhaltung normaler biologischer Verhältnisse in der Vagina. Das ständige Wechselspiel zwischen Follikelhormonspiegel und Glykogenangebot sowie Glykogenabbau und der jeweiligen Milchsäureflora kann im Sinne eines *Reglersystems* aufgefaßt werden.

Zusammenfassung

Der morphologische Wandel des Vaginalepithels auf seinem Weg von der Basis zur Oberfläche wird beschrieben, wobei folgende Zellschichten unterschieden wurden:

1 basale Zellschicht, 2 parabasale Zellschicht, 3 untere Spongiosa, 4 obere Spongiosa, 5 superfizielle Schicht. Es werden zunächst die Befunde am *Vaginal-epithel in der Schwangerschaft* mitgeteilt:

1. Im elektronenmikroskopischen Bild lassen sich in den einzelnen Schichten (1—5) charakteristische Veränderungen sowohl des Zellinhaltes, als auch der interzellulären Verbindungen festlegen.

2. Im Zytoplasma werden besonders in den unteren beiden Zellagen nur Ribosomen (Paladegranula) festgestellt. Das typische endoplasmatische Retikulum fehlt.

3. Die in den unteren Zellagen in reichem Maße anzutreffenden Mitochondrien nehmen nach der Oberfläche des Epithels zu an Zahl ab. Gleichzeitig quellen sie auf und verlieren ihre Innenstruktur.

4. Das in der unteren Zelle stets gleichmäßig strukturierte Zytoplasma läßt bereits in der parabasalen Schicht perinukleäre Aufhellungen erkennen, die in den darauf folgenden Schichten (3—5) zunehmend in elektronenoptisch leere Räume übergehen. In den oberen Zellagen ist das strukturierte Zytoplasma auf schmale randständige Bezirke beschränkt.

5. Diese leeren Räume stimmen mit der zunehmenden Ablagerung von Glykogen überein. Das morphologische Bild ergibt somit für die Stoffwechselleistung ein Maximum in den beiden basalen Zellschichten, während die maximale Glykogenspeicherung in den Schichten 3 und 4 (obere und untere spongiöse Schicht) erfolgt.

6. Es werden charakteristische Veränderungen der interzellulären Verbindungen (Desmosomen), sowie der interzellulären Räume (interdesmosomale Räume) in den einzelnen Schichten beschrieben. Die Zahl der Desmosomen nimmt in der oberen Schicht (superfizielle Schicht) erheblich zu.

7. Die nach Zahl und Form sich laufend verändernden Desmosomen sind wie die in sie einstrahlenden Tonofilamente nicht als statische, sondern als *temporäre* Gebilde aufzufassen. Diese Wandelbarkeit ist die Voraussetzung für die Erhaltung der „trajektoriiellen“ Anordnung von Tonofibrillenstrukturen im Verbands mehrschichtiger, durch laufenden Zellnachschub stets erneuernder Plattenepithelien.

8. Die polarisationsoptisch und elektronenmikroskopisch beschriebenen Tonofilamentbündel treten besonders in Zellschichten mit lang ausgezogenen Interzellularbrücken auf. Das Auftreten dieser Tonofilamente wird auf anisotrope Anordnung von Strukturelementen (Molekülketten) infolge intrazellulärer Spannungen zurückgeführt.

9. Die Ablösung der Superficialzellen des Vaginalepithels ist auf eine Veränderung der Interzellularbrücken, insbesondere der Desmosomen, zurückzuführen.

10. Die ständige Abstoßung glykogenbeladener Vaginalepithelien ist die Voraussetzung für die normale Scheidenbiologie. Ihre Aufrechterhaltung ist abhängig vom Zusammenspiel hormoneller, zellulärer und bakterieller (Milchsäureflora) Faktoren, das im Sinne eines Reglersystems gedeutet wird.

Literatur

- ALBERTINI, A. V., E. GLATTHAAR u. A. VOGEL: Zit. nach E. GLATTHAAR u. A. VOGEL.
— Elektronenmikroskopische Untersuchungen am atypischen Portioepithel. *Oncologia* (Basel) **8**, 185—194 (1955).
- BAHR, G. F., u. G. MOBERGER: Beitrag zur Kenntnis der Feinstruktur des Vaginalepithels des Menschen. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **146**, 33—42 (1956).
- BERGER, J., J. A. NEITITSCH u. E. MUMPRECHT: Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Plattenepithelveränderungen der Portio vaginalis uteri. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **18**, 510—516 (1958).
- FASSKE, E., u. H. THEMANN: Über das Deckepithel der menschlichen Mundschleimhaut. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen. *Z. Zellforsch.* **49**, 447—463 (1959).
- GLATTHAAR, E., u. A. VOGEL: Elektronenmikroskopische Studien am Portioepithel und Portiokarzinom. *Geburtsh. u. Frauenheilk.* **18**, 502—509 (1958).
- — Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen am atypischen Portioepithel (Oberflächenkarzinom). *Gynaecologia* (Basel) **148**, 182—189 (1959).
- HANSCHKE, H. J., u. H. SCHULZ: Elektronenmikroskopische Befunde an Zellen von Vaginal- und Portioabstrichen. *Arch. Gynäk.* **192**, 393—411 (1960).
- HORSTMANN, E.: Die Haut. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, Bd. III/3. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1957.
- , u. A. KNOOP: Elektronenmikroskopische Studien an der Epidermis. I. Rattenpfote. *Z. Zellforsch.* **47**, 348—362 (1958).
- KESSLER, R., u. H. D. RÖHRS: Scheidenbiologische Studien an Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern. *Arch. Gynäk.* **129**, 856—877 (1927).
- MÜLLER, D.: Die pH-Werte von Zervix und Vagina in ihrer Beziehung zur Ovarialfunktion und Konzeption. *Z. Geburtsh. Gynäk.* **155**, 272—284 (1960).
- ODLAND, G. F.: The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J. biophys. biochem. Cytol.* **4**, 529—538 (1958).
- PALADE, G. E., u. P. SIEKEVITZ: Zit. nach E. GLATTHAAR u. A. VOGEL.
- PAPANICOLAOU, G. N.: The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears. *Amer. J. Anat.* **52**, 519—637 (1933).
- , H. F. TRAUT and A. A. MARCHETTI: The epithelia of woman's reproductive organs, Commonwealth Fund, New York, 1948.
- PETRY, G., L. OVERBECK u. W. VOGEL: Sind Desmosomen statische oder temporäre Zellverbindungen? *Naturwissenschaften* **48**, 166—167 (1961).
- SELBY, C. C.: The fine structure of human epidermis as revealed by the electron microscope. *J. Soc. Cosmetic Chemists* **7**, 584—599 (1956).
- SMOLKA, H., u. H. J. SOOST: Grundriß und Atlas der gynäkologischen Zytodiagnostik. Stuttgart: Georg Thieme 1956.
- STIEVE, H.: Das Schwangerschaftswachstum und die Geburtserweiterung der menschlichen Scheide. *Z. mikr.-anat. Forsch.* **3**, 307—366 (1925).
- VOGEL, A.: Zelloberfläche und Zellverbindungen im elektronenmikroskopischen Bild. *Verh. dtsch. Ges. Path.* **41**, 284—298 (1957).
- Zum Feinbau der Interzellularbrücken nach Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure. 4. Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, S. 286—289. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- , u. E. GLATTHAAR: Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen am Portiokarzinom. *Oncologia* (Basel) **11**, 138—147 (1958).
- ZINSER, H. K.: Die Zytodiagnostik in der Gynäkologie, 2. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1957.

Prof. Dr. G. PETRY,

Anatomisches Institut, Marburg a. d. Lahn, Robert-Koch-Straße 6

Aus dem Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie an der Medizinischen Akademie
Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. med. H. RUSKA)

MORPHOLOGISCHE BEOBACHTUNGEN AN ERSCHÖPFTEN INDIREKTEN FLUGMUSKELN DER WESPE*

Von

HEINZ HOFFMEISTER

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1961)

E. HOLMGREN veröffentlichte 1909 „Studien über die stofflichen Veränderungen der quergestreiften Muskelfasern“. Er hatte an ruhenden und erschöpften Flugmuskeln von Libellen vier verschiedene morphologische Stadien beobachtet, die er jeweils besonderen Funktionszuständen zuordnen konnte. Neben den Veränderungen an der Querstreifung beschrieb er vor allem das wechselnde Aussehen der in Höhe der Querscheiben liegenden Mitochondrien (Q-Körner). Durch HOLMGRENS Beobachtungen angeregt, haben wir geprüft, ob sich zwischen ausgeruhten und erschöpften indirekten Flugmuskeln von Wespen bei der elektronenmikroskopischen Beobachtung morphologische Unterschiede zeigen. Zwar stehen die von uns verwendeten Wespen als Hautflügler (*Hymenoptera*) im System der Insekten wesentlich höher als die Libellen (*Odonata*). Auch haben sie einen abweichenden Bau der Flugmuskulatur, doch darf man vermuten, daß sich die beiden sehr mitochondrienreichen Muskeln bei der Erschöpfung ähnlich verhalten.

Die gegenwärtigen Kenntnisse über die Feinstruktur der quergestreiften Muskulatur beruhen auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen des vergangenen Jahrzehnts (DRAPER und HODGE 1949; HASSELBACH 1953; BENNET und PORTER 1953; HANSON und H. E. HUXLEY 1953; A. F. HUXLEY und NIEDERGERKE 1954; H. RUSKA 1954 und 1958; EDWARDS und H. RUSKA 1955; POCHÉ und LINDNER 1955; SJÖSTRAND und ANDERSSON 1956 und 1957; SPIRO 1956; MOORE und H. RUSKA 1957; H. RUSKA und EDWARDS 1957; LINDNER 1957; ANDERSSON-CEDERGREN 1959; H. E. HUXLEY 1960; THOENES und H. RUSKA 1960 und zahlreiche andere). Das Problem des Kontraktionsmechanismus wurde, was den morphologischen Ablauf an der Muskelfibrille angeht, vor allem durch die Untersuchungen von H. E. HUXLEY geklärt. Andere Untersucher haben unter neuen Gesichtspunkten an verschiedenen Muskeln die physiologischen Erscheinungen (ROTHSCHUH 1958; BANISTER 1960) und die enzymatischen Umsetzungen (VOGELL, BISHAI, BÜCHER, KLINGENBERG, PETTE und ZEBE 1959; HASSELBACH 1960; NEEDHAM 1960; ZEBE 1960) verfolgt. Während jedoch die oben genannten elektronenmikroskopischen Arbeiten in erster Linie deskriptiv und vergleichend morphologisch waren oder die verschiedenen Kontraktionszustände der quergestreiften Muskulatur betrafen, haben wir bei unseren Untersuchungen die Frage nach jenen Veränderungen der Skelettmuskulatur gestellt, die im Gefolge von Erschöpfung auftreten.

* Durchgeführt mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Material und Methode

Das Objekt unserer Untersuchungen war die indirekte Flugmuskulatur von *Vespa germanica* F. Für den Dauerflug befestigten wir einzelne Wespen am dorsalen Teil des Thorax mit Hilfe eines Wachstropfens an einem Holzstäbchen. Den Holzstab fixierten wir mit einem dünnen Faden frei beweglich an einer Halterung. Die Versuchstiere wurden aus etwa 60 cm Entfernung mit einem Ventilator angeblasen, so daß sie unter dem Reiz der Luftbewegung ununterbrochen bis zur vollständigen Erschöpfung flogen. Die Flugzeiten der einzelnen Tiere lagen zwischen 4 und 5 Std. Als Kontrolltiere nahmen wir Wespen, die wenigstens 24 Std in einem kleinen Glaskäfig gehalten worden waren.

Im Anschluß an die Flugversuche bzw. ohne vorausgegangene Erschöpfung wurden die Wespen mit Äther p. n. betäubt und ihr Thorax dorsal geöffnet. Auf die freigelegte, indirekte Flugmuskulatur brachten wir sofort 1% gepufferte OsO_4 -Lösung. Nach Entnahme der Flugmuskulatur unter dem Präparationsmikroskop fixierten wir 1 Std in gepufferter 1%iger OsO_4 -Lösung, entwässerten in aufsteigenden Konzentrationen von Aceton und betteten das so vorbereitete Material in Vestopal W ein (RYTER und KELLENBERGER 1958). Die Polymerisation erfolgte jeweils bei 60° C. Zur Herstellung der Dünnschnitte benutzten wir das Porter-Blum-Mikrotom. Die Aufnahmen der Schnitte wurden mit dem Siemens Elmiskop I angefertigt.

Beschreibung der Befunde

Die indirekte Flugmuskulatur der Wespe (in Ruhe) zeigt den typischen Aufbau des hochfrequenten Insektenmuskels (CHAPMAN 1954; EDWARDS und H. RUSKA 1955). In Abb. 1 sehen wir einen Ausschnitt aus einer normalen, längsgeschnittenen Flugmuskelfaser. Die über die ganze Faserlänge streng voneinander getrennt verlaufenden Myofibrillen sind parallel zueinander angeordnet. Man erkennt deutlich ihre Zusammensetzung aus Myofilamenten. Bei der in regelmäßigen Abständen auftretenden Querstreifung sind *A*, *H*, *M* und *Z* gut voneinander zu unterscheiden. Das *I*-Band ist wegen der geringen physiologischen Kontraktion dieses Muskeltyps (3% seiner Länge) meist undeutlich. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man zwischen den einzelnen Myofilamenten fadenförmige Brücken, die für den Kontraktionsmechanismus von Bedeutung sind. Um die Myofibrillen und parallel zu ihnen liegen kettenförmig aneinander gereihete Mitochondrien. Die Cristae mitochondriales sind eng gepackt und stark gefaltet. In engem räumlichen Kontakt zu den Mitochondrien finden sich Tracheolen, die senkrecht zu den längsgeschnittenen Myofibrillen, und zwar jeweils in Höhe des *M*-Bandes verlaufen.

Im schräg geschnittenen Flugmuskel (Abb. 2, Schnittwinkel etwa 45°) stellen sich die Myofibrillen als ovale Scheiben dar. Die Myofilamente bilden darin ein feines Fadenmuster. *A*-Bänder, *M*- *H*- und *Z*-Streifen sind auch bei dieser Schnittrichtung gut zu erkennen. Im Sarkoplasma liegen um die Fibrillen angeordnet Mitochondrien, deren Cristae in Abb. 2 nahezu senkrecht zu der Schnittebene liegen und deshalb deutlich voneinander zu unterscheiden sind. Zwischen den Mitochondrien verläuft eine in diesem Schnitt längs getroffene Tracheole. Alle Tracheolen sind innerhalb der Muskelfasern vom Sarkoplasma durch die Plasmamembran der Tracheoblasten abgetrennt (EDWARDS, H. RUSKA und DE HARVEN 1958). Kleine und größere Bläschen (Abb. 2), die in der Nähe der Faseroberfläche liegen, nehmen oft den ganzen Raum zwischen Muskelfibrillen und Mitochondrien ein (Abb. 3). Inmitten der einzelnen Bläschen finden sich auch solche, die zu mehreren zusammengefaßt, von einer gemeinsamen Membran umgeben sind. Ähnliche Gebilde finden sich in dem nur sehr spärlich vorhandenen Tracheoplasma der intrazellulären Tracheolen (Abb. 4).

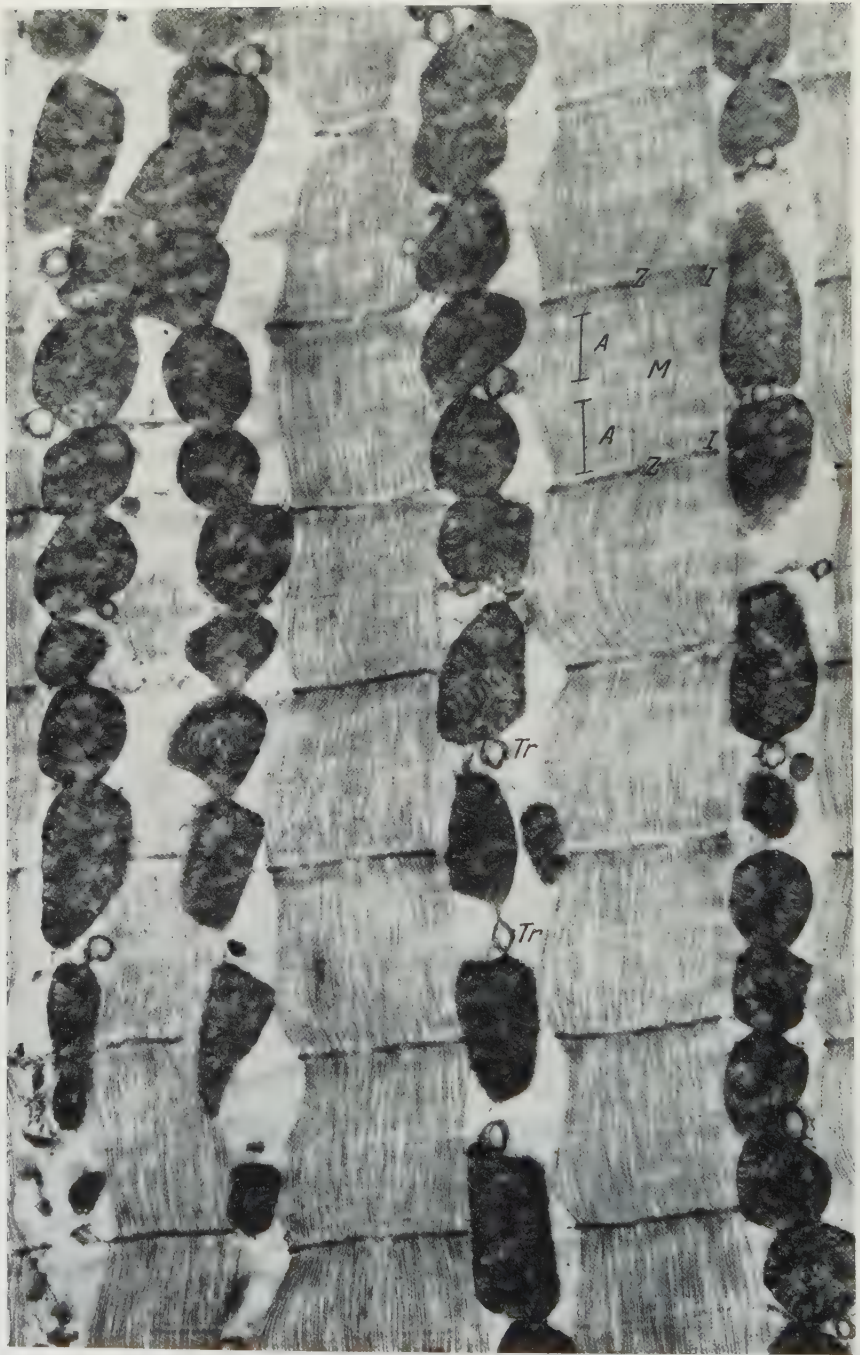


Abb. 1. Teil einer normalen, längsgeschnittenen Flugmuskelfaser. Die in ganzer Länge getrennt liegenden Myofibrillen zeigen den Aufbau aus parallel verlaufenden Myofilamenten. Regelmäßige Querstreifung der Myofibrillen mit deutlich zu unterscheidenden *A*-, *H*-, *M*- und *Z*-Bändern. Zwischen den Fibrillen bandförmig angeordnet die mit sehr zahlreichen Cristae versehenen Mitochondrien. Im interfibrillären Raum jeweils in Höhe des *M*-Bandes quergetroffene Tracheolen (*Tr*). Vergrößerung: 13000:1

In Abb. 5 ist die Flugmuskulatur im Bereich eines schräg zu den Myofilamenten verlaufenden Z-Bandes senkrecht zu den Myofilamenten getroffen. Man erkennt deutlich die hexagonale Anordnung der Myofilamente, wie sie von

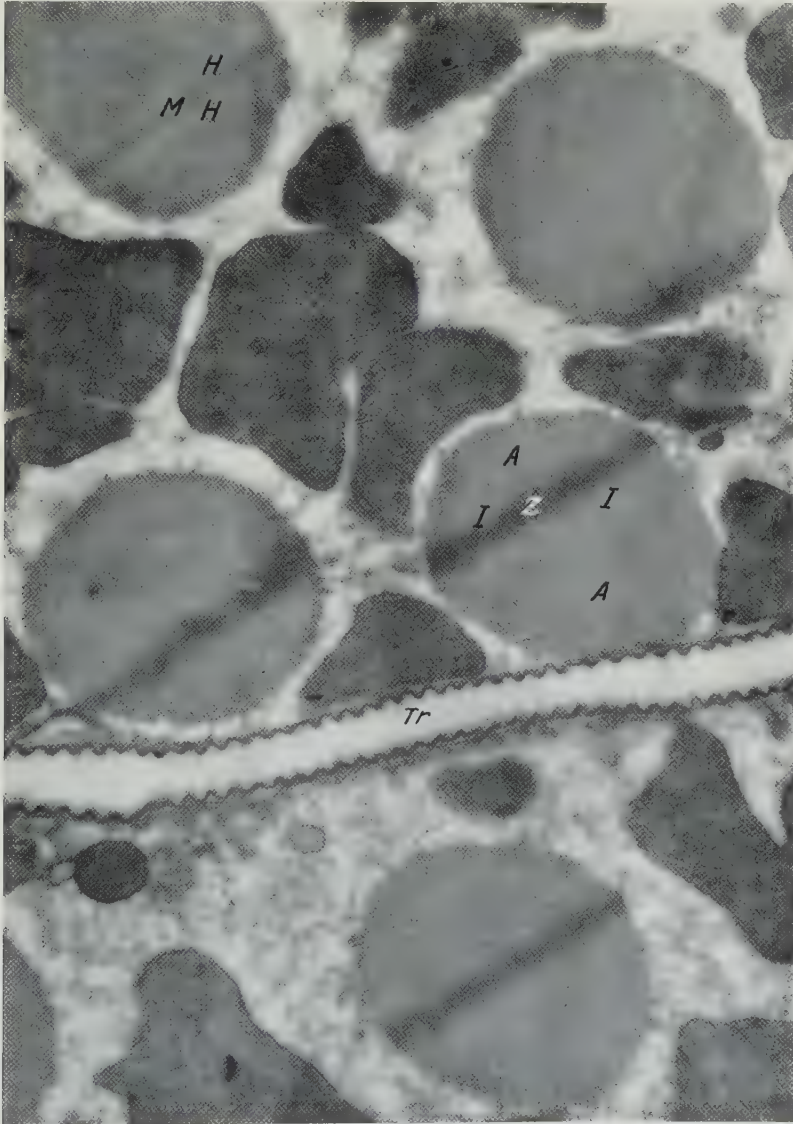


Abb. 2. Schräggeschnittene Myofibrillen mit *A*-, *H*-, *M*- und *Z*-Streifen. Um die Fibrillen im Sarkoplasma reichlich Mitochondrien. Längsgetroffene Tracheole (*Tr*). Vergrößerung: 20000:1

H. E. HUXLEY (1953, 1957, 1960) beschrieben wurde. Die punktförmigen Filamentquerschnitte sind durch Proteinfäden (crossbridges) miteinander verknüpft, die in der Schnittebene verlaufen. An Hand einer Rekonstruktion der querschnittenen Fibrillen der Flugmuskulatur der Wespe (Abb. 6) wird deutlich, daß jedes Filament durch 6 Querbrücken gleicher Länge mit 6 anderen Filamenten

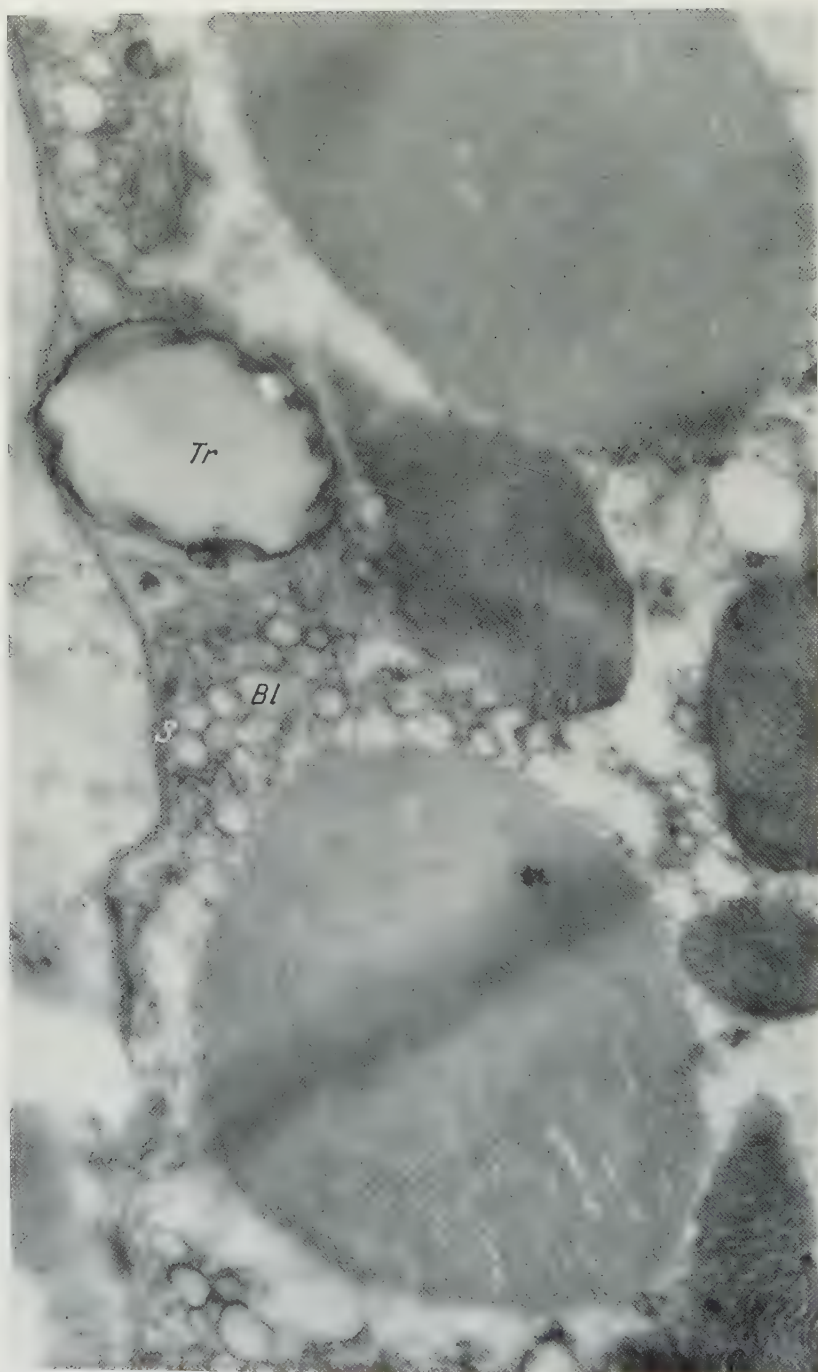


Abb. 3. Randbezirk einer schräggeschnittenen Flugmuskelfaser. Links im Bild Sarkolemm (S) mit großer Tracheole (Tr). Nahe der Faseroberfläche zahlreiche kleinere und größere Bläschen (Bl), die den Raum zwischen Fibrillen und Mitochondrien ausfüllen. Vergrößerung: 30000:1

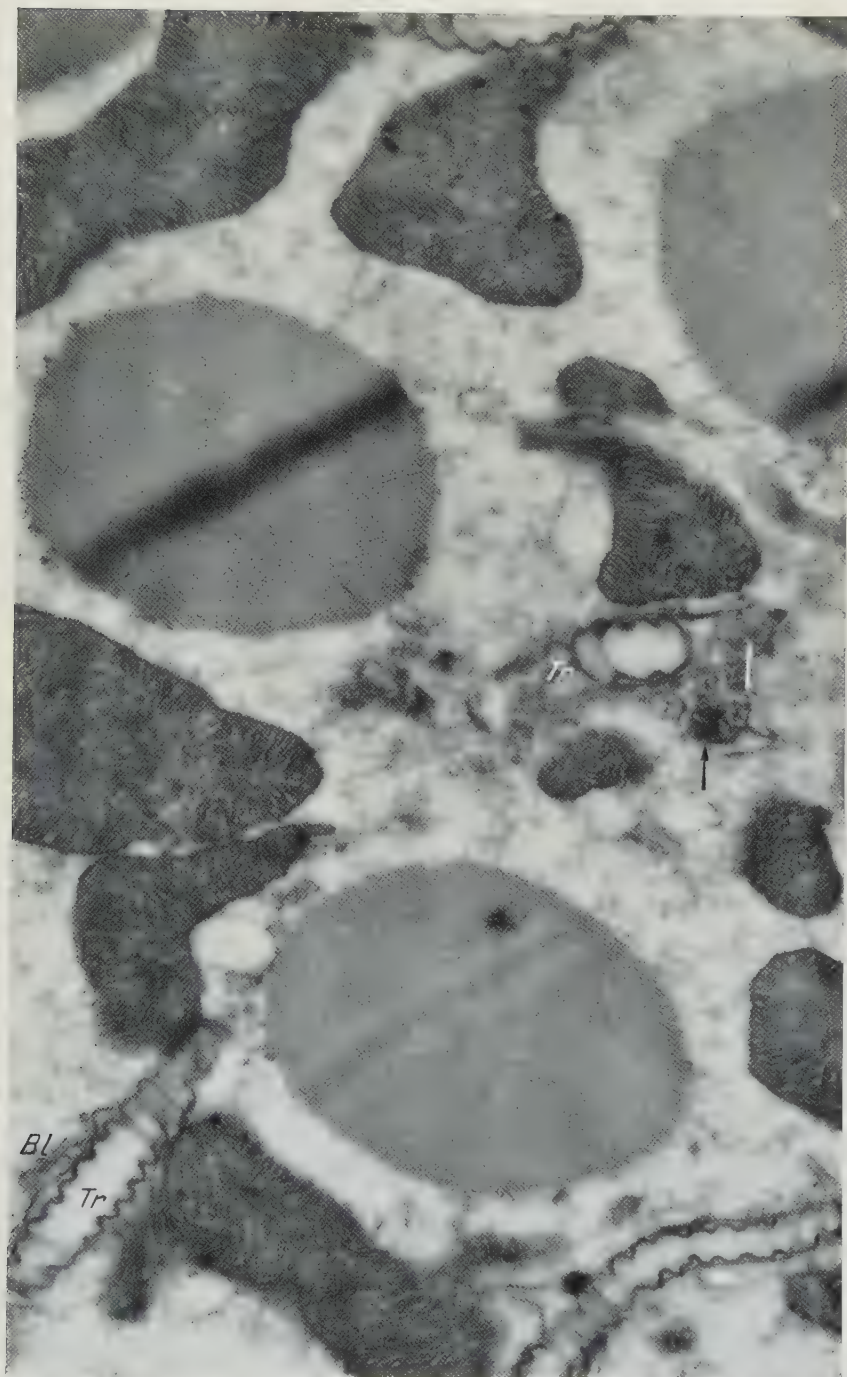


Abb. 4. Schräggeschnittene Myofibrillen mit völlig ungestörtem Myofilamentmuster, umgeben von zahlreichen Mitochondrien. Längsgeschnittene Tracheolen mit z. T. im Tracheoplasma gelegenen kleinen Bläschen (Bl), die an zwei Stellen (Pfeile) durch eine gemeinsame Membran zu mehreren zusammengefaßt sind. Vergrößerung: 24000:1

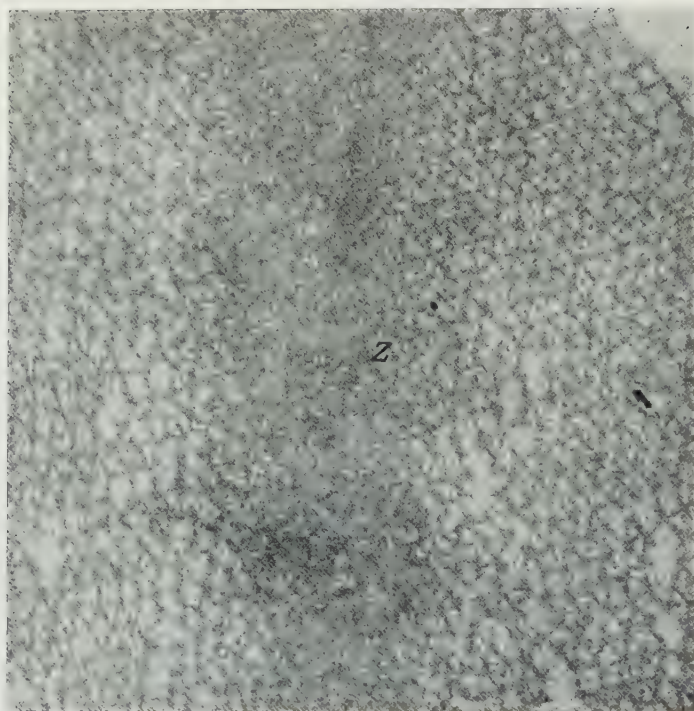


Abb. 5. Teil einer quergeschnittenen Myofibrille im Bereich eines schräg zu den Myofilamenten verlaufenden Z-Bandes (Z). Die Myofilamente sind durch fädige Querbrücken verbunden. Seitenlänge der gleichseitigen Dreiecke (rechts oben) $30\text{ m}\mu$. Vergrößerung: 100 000:1

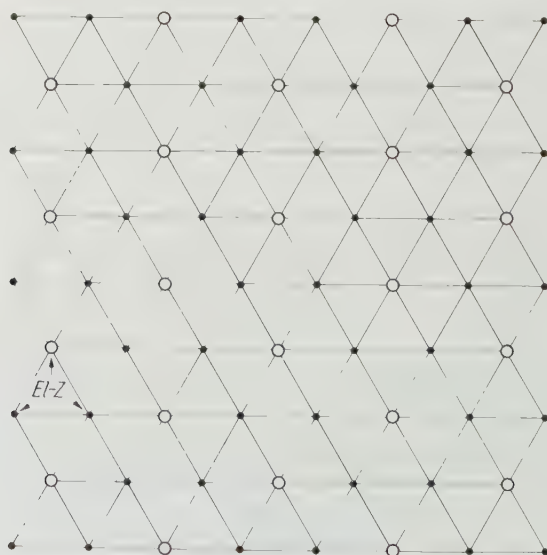


Abb. 6. Rekonstruktion des quergeschnittenen Myofilamentmusters im A-Band. Myosinfilamente als Kreise, Actinfilamente als Punkte gezeichnet. Die Filamente sind durch fädige Querbrücken verbunden. „Elementarzelle“ (El-Z) dargestellt durch ein Myosinfilament und zwei Actinfilamente verknüpft durch zwei Myosin-Actin-Brücken und eine Actin-Actin-Brücke. Kürzester Abstand der Myosinfäden $52\text{ m}\mu$ bei einem Abstand der Actinfäden von $30\text{ m}\mu$



Abb. 7. Teil einer längsgeschnittenen, erschöpften Flugmuskelfaser. Auffallend breite Z-Bänder. Leicht geschwollene (abgerundete und aufgelockerte) Mitochondrien, dazwischen zerstörte Mitochondrien. Vergrößerung: 15 000:1

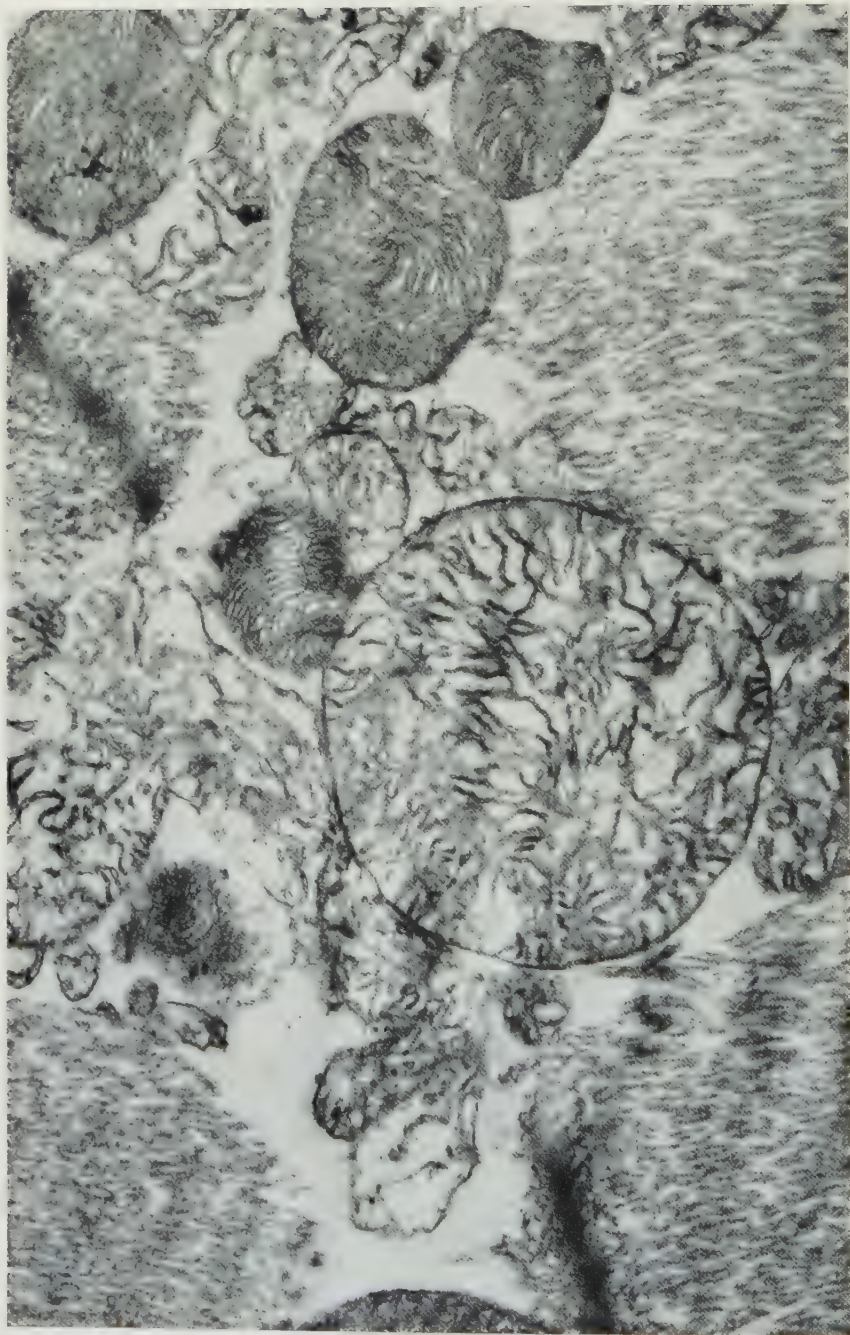


Abb. 8. Schräggeschnittene Myofibrillen mit gestörtem Verlauf der Myofilamente. Neben nur leicht geschwollenen Mitochondrien in der Bildmitte ein stark geschwollenes, kugelförmiges Mitochondrion. Außerdem freiliegende Innenmembranen, die mit Verlust der äußeren Membran auch ihre für Mitochondrien typische Form verloren haben. Vergrößerung: 32000:1

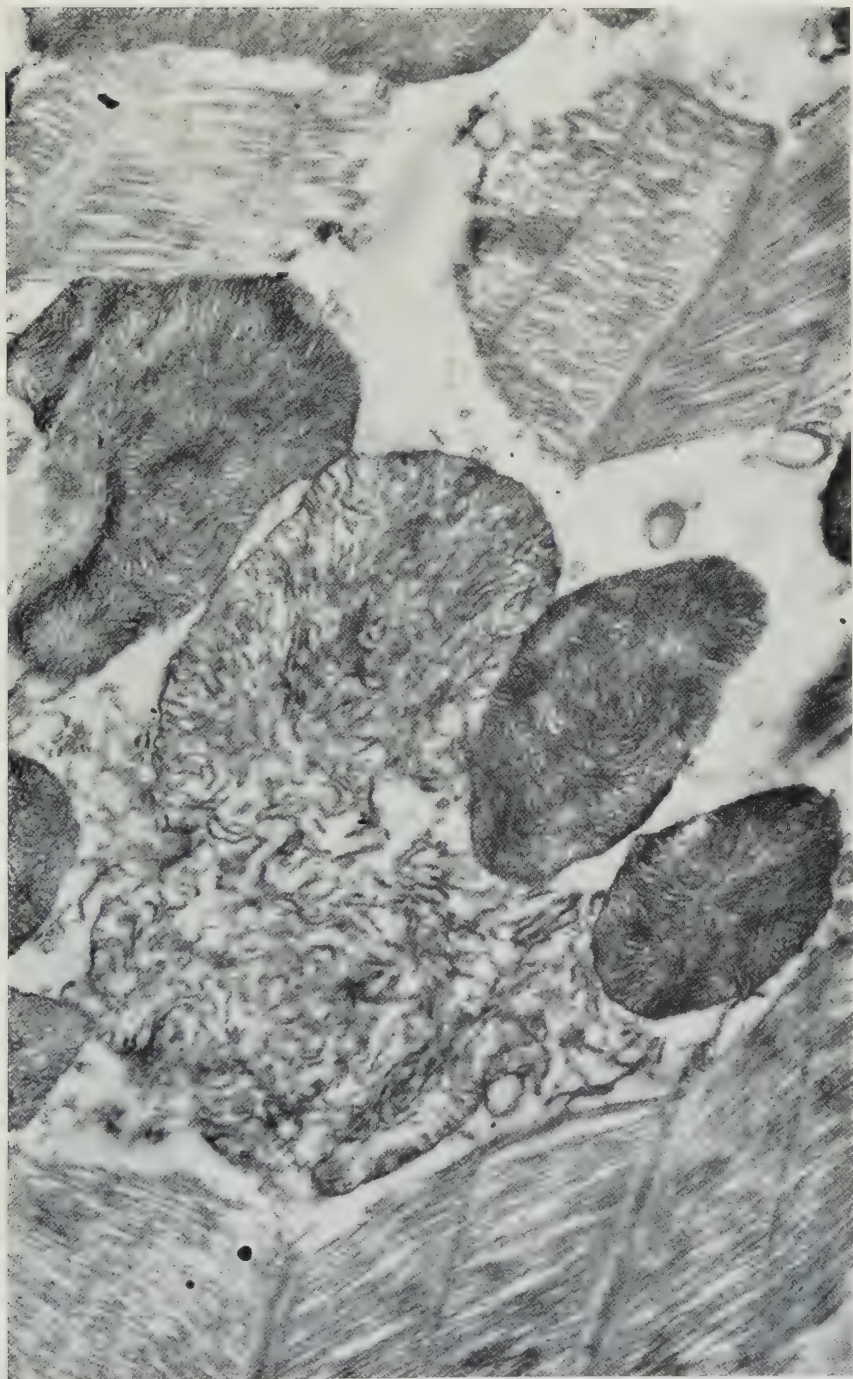


Abb. 9. In Bildmitte stark geschwollenes Mitochondrion mit an mehreren Stellen zerstörter Außenmembran. Die Innenmembran hat in der unteren Mitochondrienhälfte ihren Zusammenhalt verloren und liegt z. T. frei im Cytoplasma. Vergrößerung: 28 000:1

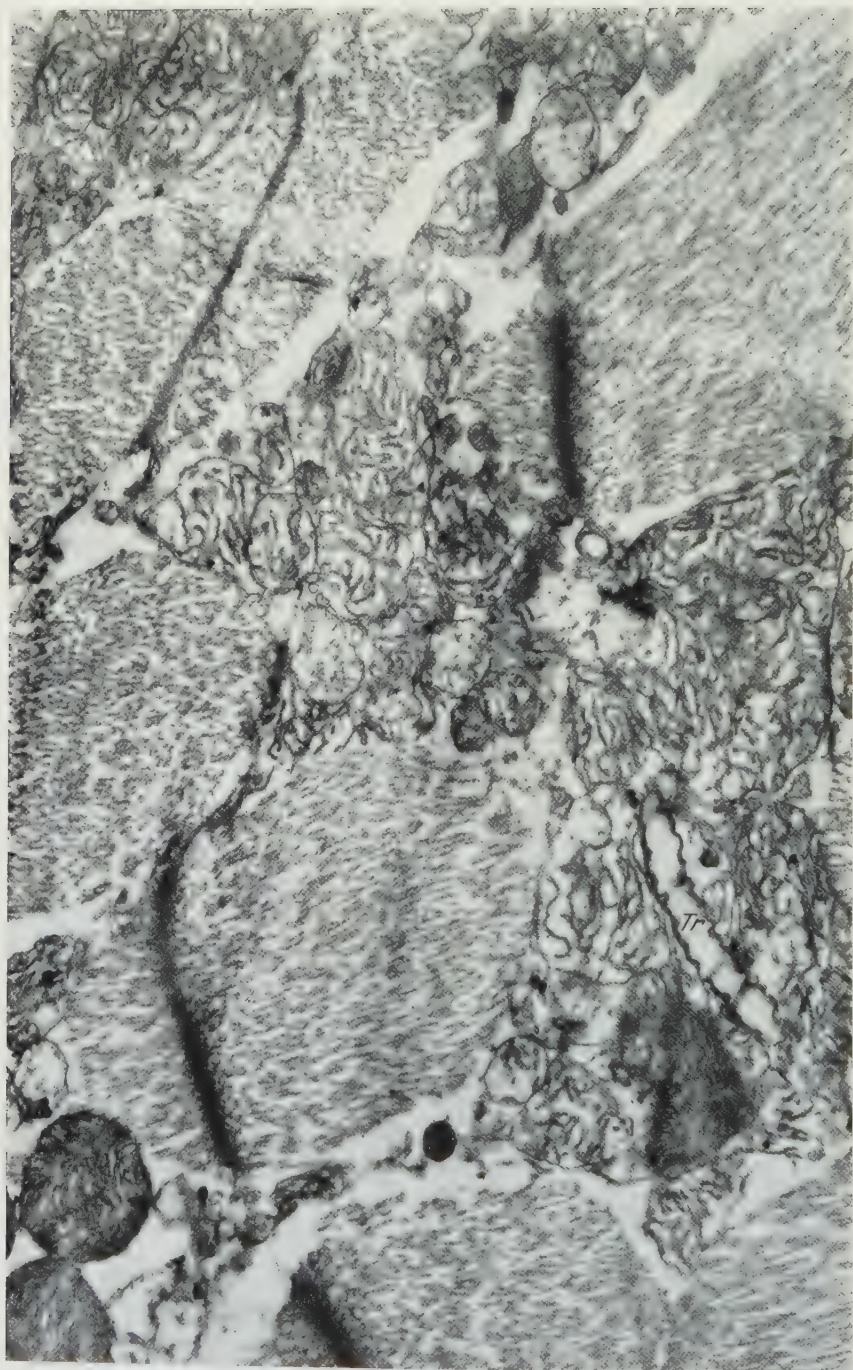


Abb. 10. Teil einer schräggeschnittenen Flugmuskelfaser mit auffallend gestörtem Verlauf der Myofilamente. Nur noch wenig intakte Mitochondrien. Frei im Cytoplasma liegende Innenmembranen füllen fast den ganzen interfibrillären Raum aus. Längsgeschnittene Tracheole (*Tr*) inmitten freiliegender Innenmembranen. Vergrößerung: 28 000:1

verbunden ist. Zwei Myosinfilamente stehen jedoch nie direkt über Querbrücken miteinander in Verbindung, sondern es liegen jeweils zwei untereinander verbundene Actinfilamente dazwischen. Drei Querbrücken zusammen bilden ein gleichseitiges Dreieck, dessen Seiten bei unserem Objekt 30 m μ betragen. Die „Elementarzelle des Muskelkristalls“ besteht im A-Band aus 1 Myosinfaden und 2 Actinfäden, die durch 1 Actin-Actinbrücke und 2 Actin-Myosinbrücken verbunden sind.

Das endoplasmatische Retikulum der indirekten Flugmuskulatur ist im Gegensatz zu dem in anderen Muskelgruppen der Insekten sehr spärlich ausgebildet. Der Grund hierfür dürfte in der geringen physiologischen Verkürzung dieser Muskeln liegen. Wo sich das endoplasmatische Retikulum nachweisen läßt, ist es immer in der Z-Ebene orientiert.

Der Ausschnitt aus einer *erschöpften* Flugmuskelfaser in Abb. 7 zeigt wie beim ruhenden Muskel eine parallele Anordnung der Myofibrillen. Bezüglich der Querstreifung fällt die ungewöhnliche Breite des Z-Bandes auf (Störung der Relaxation). Die Myofilamente laufen nicht völlig gerade und sind bei Durchsicht eines größeren Materials im ganzen ungeordneter als bei der ausgeruhten Muskulatur. Auch in Schrägschnitten (Schnittwinkel etwa 50°) ist zu erkennen, daß die Myofilamente nicht mehr in optimaler Ordnung verlaufen (Abb. 8, 9, 10). Zwischen den Filamenten finden sich verschieden große Abstände. In den Abb. 8 und 10 sind die Z-Streifen wiederum verhältnismäßig breit.

Die „normalen“ Mitochondrien berühren sich in Abb. 7 gegenseitig über größere Flächen als in Abb. 1, ihre Formen sind abgerundeter und die intercrystalen Räume weiter. Daher sind die Cristae im Längsschnitt schon gut zu erkennen. Neben den „normalen“ Mitochondrien finden sich deutlich geschwollene, aufgelockerte und verformte Mitochondrienreste. In Abb. 8 liegt ein sehr stark geschwollenes Mitochondrion in der Bildmitte. Es hat Kugelform angenommen und seine Innenmembranen sind entsprechend auseinander gerückt. An dem zentral gelegenen Mitochondrion in Abb. 9 ist die Außenschicht an mehreren Stellen gesprengt und der Mitochondrieninhalt ist im Begriff auszufließen. Außerdem finden sich ausgetretene Innenmembranen überall zwischen Mitochondrien verschiedener Schwellungszustände (Abb. 7—10). Die Tracheolen verlaufen sowohl inmitten zerstörter als auch in der Nähe intakter Mitochondrien. Es läßt sich nicht nachweisen, daß die Mitochondrien in Nähe der Tracheolen (Abb. 10) besser erhalten sind als in schlecht tracheolisierten Gebieten. Die zahlreichen im ruhenden Muskel beschriebenen Bläschen konnten in den Bildern vom erschöpften Muskel nicht beobachtet werden.

Diskussion

Die histologische Struktur einer Muskelfaser ist auf die geforderte Leistung zugeschnitten. Die Proteinfilamente der Myofibrillen bilden das morphologische Substrat für Haltefunktion und Verkürzung. In unseren Präparaten von der Flugmuskulatur der Wespe zeigt die Anordnung der Myofilamente am ruhenden Muskel volle Übereinstimmung mit den Befunden, die von den früher genannten Autoren über die hochfrequente indirekte Flugmuskulatur der Insekten erhoben wurde (Abb. 1, 2). Auffallend ist der enge Kontakt der Mitochondrien mit den Myofibrillen und den Tracheolen sowie die große Zahl der Mitochondrien im

Verhältnis zur Gesamtzahl der Sarkomere (mehr als 1:1). Beides wird von der Funktion her verständlich. Die Wespe macht etwa 200 Flügelschläge pro Sekunde und kann die hierzu erforderliche Arbeit viele Stunden lang leisten. Diese Leistung kann nur aufgebracht werden, wenn genügend Energie über längere Zeit bereitgestellt wird. Die morphologischen Voraussetzungen dafür sind in dem Mitochondrien-Tracheolen-Kontinuum (EDWARDS, H. RUSKA, SOUZA SANTOS und VALLEJO-FREIRE 1956) gegeben. Das Mitochondrien-Tracheolen-Kontinuum bedingt einen minimalen Diffusionsweg für Sauerstoff und führt zur ständigen

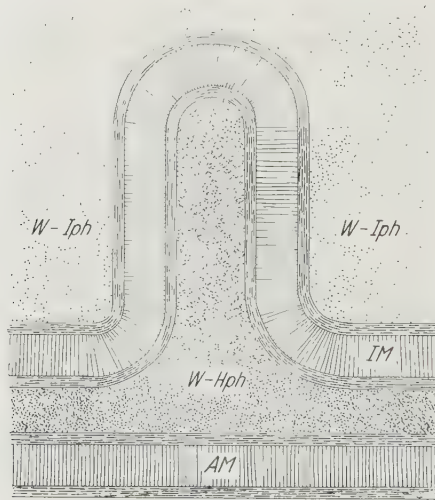


Abb. 11. Halbschematische Darstellung der äußeren und inneren Mitochondrienmembranen (*AM* und *IM*). Längsstriche deuten die Proteinschichten (15 Å) und Querstriche die Lipidschichten (55 Å) an. Die „wäßrige Hüllphase“ (*W-Hph*) zwischen der Außen- und Innenmembran des Mitochondrions und in der Crista ist stärker punktiert dargestellt als die „wäßrige Innenphase“ (*W-Iph*)

Verfügbarkeit von ATP, es reduziert aber die Kraft pro Querschnitt der Muskelfaser.

Im Gegensatz zu den Befunden an der Flugmuskulatur in Ruhe (siehe insbesondere die Querschnittsbilder Abb. 2—5) sind die Filamente in den Myofibrillen der erschöpften Muskulatur oft nicht mehr völlig geordnet (Abb. 8—10). Sowohl in Längs- als auch in Querschnitten erkennt man eine deutliche Auflockerung der Filamentbündel, denen die in Abb. 6 schematisch dargestellte ideale Ordnung fehlt. Ob dieser Befund, der bei unseren Untersuchungen immer nur am erschöpften Muskel aufgetreten ist, einen echten „Erschöpfungseffekt“ darstellt, soll hier nur zur Diskussion gestellt werden. Wo viele Muskelpräparate untersucht worden sind, ist bekannt, daß die geometrisch ideale, für die Kontraktion optimal wirksame Anordnung der Filamente, von der Präparation abgesehen, ohne ersichtlichen Grund gestört sein kann.

Einen eindeutigen Erschöpfungseffekt zeigen jedoch die Mitochondrien, d. h. einen Effekt, der nicht aus „Normalpräparaten“ geläufig ist. Durch Mitochondrienschwellungen, die sich *in vitro* nephelometrisch oder phasenkontrastmikroskopisch laufend beobachten lassen, ist bekannt, daß die Mitochondrien eine wäßrige Phase (mindestens eine!) enthalten müssen. Die Schwellung ist

ihrer Natur nach osmotisch und daher abhängig von Permeabilitätseigenschaften der Membran (oder der Membranen), von den einwirkenden Substanzen und von eventuellen Effekten dieser Substanzen auf die Permeabilität (siehe z. B. C. RUSKA 1960, 1961). In der elektronenmikroskopischen Literatur ist das Äquivalentbild der wäßrigen Innenphase nicht sehr glücklich oft als Grundsubstanz, Granulation oder auch als Matrix der Mitochondrien bezeichnet worden. Auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen wurde der Feinbau vieler Mitochondrien beschrieben, ohne jedoch hinsichtlich der Membranverhältnisse und der eingeschlossenen wäßrigen Phasen eine einheitliche Deutung zu erfahren. Es wird eine äußere und eine innere Membran unterschieden (Abb. 11). Die innere Membran ist infolge der Ausbildung unterschiedlich vieler, verschieden geformter Cristae oder Tubuli größer als die äußere Membran. Sie begrenzt mit ihrer Innenfläche die „wäßrige Innenphase“, in die die Cristae bzw. Tubuli hineinragen. Die Außenfläche der inneren Membran grenzt unserer Auffassung nach ebenfalls an eine wäßrige Phase, „die Hüllphase“, die sich in die Cristae bzw. Tubuli hinein fortsetzt. Die äußere Membran begrenzt die wäßrige Hüllphase mit ihrer Innenfläche und bildet nach außen den Abschluß des Mitochondrions gegen seine Umgebung. Das Mitochondrion besteht also aus zwei „festen“ Membranphasen und zwei wäßrigen Phasen.

Die äußere Membran kann unabhängig von der Innenmembran abgebaut werden, wie es VALLEJO-FREIRE und BRUNNER (1957/58) am reifenden Erythrozyten und LINDNER (1957) am Herzmuskel beobachtet haben. Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist weiterhin bekannt, daß es bei einer Mitochondrienschwellung zur Volumenzunahme vorwiegend in der Innenphase oder auch in beiden wäßrigen Phasen kommen kann. An Häufigkeit überwiegt die Volumenzunahme der inneren wäßrigen Phase in sehr verschiedenen Abstufungen (Abb. 7, 8). Bei den von H. SCHULZ (1959) hervorgehobenen Formen der „vakuolären“ und „lamellären Transformation“ handelt es sich um Formen mit relativer Zunahme der wäßrigen Hüllphase.

Unserer Auffassung nach entspricht der Bau des Mitochondrions der allgemein gültigen Regel, daß eine Membranphase stets zwei *verschiedene* wäßrige Phasen trennt (H. RUSKA 1960), (Abb. 11). Das wäre für die Cristae bzw. Tubuli nicht der Fall, wenn man weiterhin äußere und innere Membran mit der dazwischen liegenden wäßrigen Hüllphase als einheitliche „Doppelmembran“ auffaßte. Die biochemischen Umsetzungen der Mitochondrien verlaufen wahrscheinlich unter regeltem Wechsel der ein- und austretenden Reaktionsprodukte zwischen den jeweils verschiedenen zwei Membranphasen und wäßrigen Phasen.

Es ist oft vermutet worden, daß in geschwollenen Mitochondrien die Innenmembranen reduziert seien. Diese Auffassung ließ sich zum mindesten nie wirklich erweisen. Denkt man sich Mitochondrien als Rotationsellipsoide mit dem Achsenverhältnis a/b (a = große Halbachse, b = kleine Halbachse) zu Kugeln gleicher Oberfläche transformiert, so errechnet sich aus der Formel:

$$\frac{r_0}{b} = \left[\frac{1}{2} \left(1 + \frac{a \arcsin \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}}{b \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}} \right) \right]^{\frac{1}{2}}$$

das Verhältnis des sich ergebenden Kugelradius (r_0) zur *kleinen* Halbachse (b) des ursprünglichen Rotationsellipsoids und aus der Formel:

$$\frac{V_K}{V_E} = \frac{b}{a} \left[\frac{1}{2} \left(1 + \frac{a \arcsin \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}}{b \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}} \right) \right]^{\frac{3}{2}}$$

errechnet sich das Verhältnis des Volumens der sich ergebenden Kugel (V_K) zum Volumen des ursprünglichen Rotationsellipsoids (V_E). Die Werte sind aus der graphischen Darstellung (Abb. 12) direkt abzulesen.

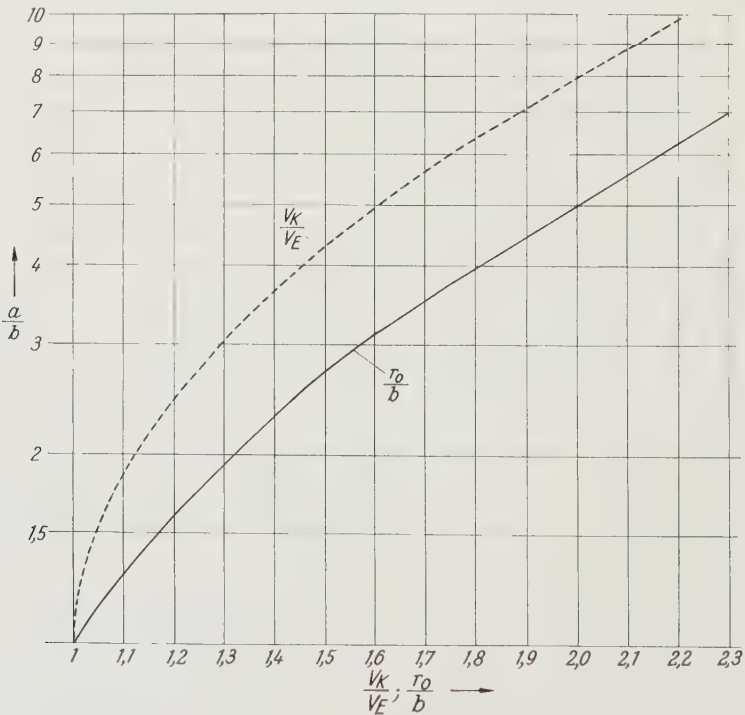


Abb. 12. Graphische Darstellung der Werte für $\frac{r_0}{b}$ (durchgezogene Kurve) und der Werte für $\frac{V_K}{V_E}$ (gestrichelte Kurve). An der Ordinate ist das Verhältnis $\frac{a}{b}$ aufgetragen, an der Abszisse sind die Werte für den Radius bzw. das Volumen der sich ergebenden Kugel abzulesen

Denkt man sich außerdem die Cristae mitochondriales mit zentralen kreisförmigen Aussparungen von Radien r_i (Abb. 13, obere Hälfte) als ebene Querschnittsflächen, von denen wir beim Übergang des Rotationsellipsoids in die Kugel verlangen, daß sie wiederum gleichmäßig über deren Radius verteilt sind und daß ihre Oberflächen gleich bleiben, so erhalten wir die neuen Radien der inneren Aussparungen (Abb. 13, untere Hälfte). Es liegen n ebene Querschnittsflächen in einem Rotationsellipsoid senkrecht zur großen Halbachse a gleichmäßig verteilt. Aus ihnen sind zentral Kreisflächen πr^2 ausgespart. Beim Übergang des Rotationsellipsoids in eine Kugel sollen diese Flächen flächengleich als Querschnitte

gleichmäßig über den Radius verteilt werden. Dabei ist der sich jetzt ergebende Innenradius r_x gefragt. Die Gleichung des die große Halbachse enthaltenden Schnittes des Rotationsellipsoids ist:

$$\frac{y_E^2}{a^2} + \frac{x_E^2}{b^2} = 1; \quad x_E^2 = b^2 \left(1 - \frac{y_E^2}{a^2} \right).$$

Für den Schnitt durch die Kugel gilt die Gleichung:

$$y_K^2 + x_K^2 = r^2; \quad x_K^2 = r^2 \left(1 - \frac{y_K^2}{r^2} \right).$$

Die Lagekoordinate der Fläche mit der Ordnungsnummer i , $i = 0; 1 \dots n$ ist gegeben durch

$$y_E = a \frac{i}{n} \quad \text{und} \quad y_K = r \frac{i}{n}.$$

Die Flächengleichheit wird verlangt durch:

$$x_E^2 - r_i^2 = x_K^2 - r_x^2.$$

Es ist also

$$r_x = b \sqrt{\left[1 - \left(\frac{i}{n} \right)^2 \right] \left[\left(\frac{r}{b} \right)^2 - 1 \right] + \left(\frac{r_i}{b} \right)^2}.$$

Die Anwendung dieser Formeln auf ein Rotationsellipsoid mit dem Achsenverhältnis $\frac{a}{b} = 3$ und den als Querschnittsflächen angenommenen 9 Etagen mit zentral ausgesparten gleichen Kreisflächen ergibt die oberflächengleiche Kugel der Abb. 13 mit erheblicher Verkürzung der flächengleichen Kugeltagen.¹

Denkt man sich eine Schicht zwischen zwei Schnitten durch ein kugelförmig geschwollenes Mitochondrion, so wird verständlich, daß 1. die Cristae viel kürzer geworden sein müssen als in dem ursprünglichen Mitochondrion und daß 2. in Abhängigkeit von der Schnittrichtung und der Schichtdicke die sichtbare Zahl der Cristae bis auf Null abgenommen haben kann. Die

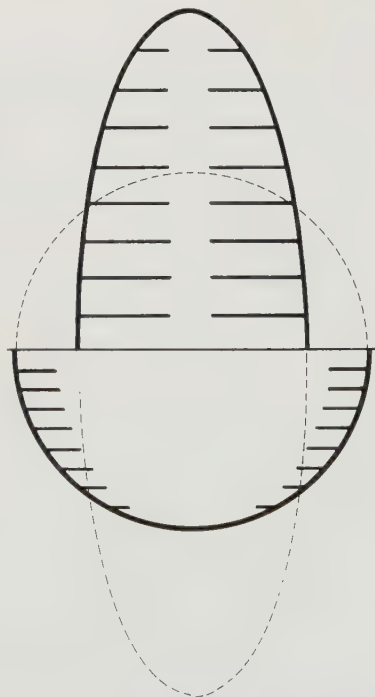


Abb. 13. Schematische Darstellung der Transformation eines Rotationsellipsoids (Achsenverhältnis $\frac{a}{b} = 3$) mit 9 analog den Cristae mitochondriales eingebautem Etagen in eine Kugel gleicher Oberfläche und in flächengleiche Etagen

¹ Für die Durchführung der mathematischen und numerischen Berechnungen bin ich Herrn Dipl. Phys. MAX HAHN sehr zu Dank verpflichtet.

Länge der Cristae wird um so mehr abnehmen, je größer das Achsenverhältnis $\left(\frac{a}{b}\right)$ des ursprünglichen Mitochondrions gewesen ist. An Hand dieser Überlegungen wird deutlich, daß der immer wieder beschriebene „Schwund“ der Innenmembranen in geschwollenen Mitochondrien wahrscheinlich nicht existiert.

Die unmittelbare Ursache für die Mitochondrienschwellung bei der Erschöpfung und die Gründe für das ungleiche Verhalten der Mitochondrienpopulation innerhalb einer Muskelfaser lassen sich nicht angeben. Als Folge mechanischer Zerstörung der Mitochondrien kann in Analogie zu den in vitro Versuchen von GREEN (1958 und 1959) eine Störung im Citronensäurecyclus angenommen werden, die trotz erhaltener Elektronenübertragung und oxydativer Phosphorylation in den Membranresten die Energieversorgung der Zelle beeinträchtigen muß.

Die Frage, ob und wie sich die Mitochondrien nach der Erschöpfung wiederherstellen, soll in einer weiteren Untersuchung geprüft werden.

Zusammenfassung

Muskelfasern aus der erschöpften indirekten Flugmuskulatur von Wespen (*Vespa germanica* F.) zeigen deutliche morphologische Unterschiede gegenüber Fasern aus der ausgeruhten Muskulatur.

1. Die Myofilamente der Muskelfibrillen aus erschöpften Fasern haben häufig ihre optimale Ordnung verloren. Dieser Ordnungsverlust muß, falls er auch in vivo existiert, den Kontraktionsmechanismus beeinträchtigen.

2. Die Z-Streifen der Myofibrillen aus erschöpften Fasern sind oft verbreitert, was als Störung der Relaxation gedeutet werden kann.

3. Die Mitochondrien sind ausnahmslos, wenn auch in sehr verschiedenem Ausmaß, geschwollen. Der höchste Grad der Schädigung besteht in Sprengung ihrer äußeren Membran, die zum Verlust der typischen Mitochondrienform führt. Funktionell dürfte diese Veränderung eine Beeinträchtigung des Citronensäurecyclus zur Folge haben.

Die Beobachtungen an den Mitochondrien gaben Veranlassung, die Mehrphasigkeit der Mitochondrien und die Folgen der Schwellung für das Schnittbild der Mitochondrien ausführlicher zu diskutieren.

Literatur

- ANDERSSON-CEDERGREN, E.: Ultrastructure of motor end plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *J. ultrastruct. Res.*, Suppl. **1**, 191 S. (1959).
- BANNISTER, R. G.: The physiology of muscular exercise. In: *The structure and function of muscle*, Vol. 2, pp. 435—448. New York: Academic Press 1960.
- BENNETT, H. ST., and K. R. PORTER: An electron microscope study of sectioned breast muscle of the domestic fowl. *Amer. J. Anat.* **93**, 61—105 (1953).
- CHAPMAN, G. B.: Electron microscopy of ultra-thin sections of insect flight muscle. *J. Morph.* **95**, 237—262 (1954).
- DRAPER, M. H., and A. J. HODGE: Studies on muscle with the electron microscope. I. The ultrastructure of toad striated muscle. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.* **27**, 465—503 (1949).
- EDWARDS, G. A., and H. RUSKA: The function and metabolism of certain insect muscles in relation to their structure. *Quart. J. micr. Sci.* **96**, 151—159 (1955).
- and E. DE HARVEN: The fine structure of insect tracheoblasts, tracheae and tracheoles. *Arch. Biol. (Liège)* **69**, 351—369 (1958).

- EDWARDS, G. A., and H. RUSKA: P. SOUZA SANTOS and A. VALLEJO-FREIRE: Comparative cytophysiology of striated muscle with special reference to the role of the endoplasmic reticulum. *J. biophys. biochem. Cytol. Suppl.* **2**, 143—156 (1956).
- GREEN, D. E.: Studies in organized enzyme systems. *Harvey Lect. Series* **52**, 177—227 (1958).
- Biological oxidation. *Sci. Amer.* **199**, 56—62 (1958).
- Electron transport and oxidative phosphorylation. *Advanc. Enzymol.* **21**, 73—129 (1959).
- Mitochondrial structure and function. In: *Subcellular particles*, pp. 84—103. New York: Ronald Press Company 1959.
- HANSON, J., and H. E. HUXLEY: Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature (Lond.)* **172**, 530 (1953).
- HASSELBACH, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Muskelfibrillen bei totaler und partieller Extraktion des L-Myosins. *Z. Naturforsch.* **8b**, 449—454 (1953).
- Zur Zytochemie des Herzmuskels. *Acta Tertii Europaei de Cordis Acientia Conventus, Rom 1960, Excerpta med. S.* 113—123.
- HOLMGREN, E.: Studien über die stofflichen Veränderungen der quergestreiften Muskelfasern. *Skand. Arch. Physiol.* **21**, 287—314 (1909).
- HUXLEY, A. F., and R. NIEDERGERKE: Structural changes in muscle during contraction. *Nature (Lond.)* **173**, 971—973 (1954).
- HUXLEY, H. E.: Electron microscope studies of the organization of the filaments in striated muscle. *Biochim. biophys. Acta* **12**, 387—94 (1953).
- The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 631—648 (1957).
- The structure of striated muscle. In: *Molecular biology. Elementary processes of nerve conduction and muscle contraction*, pp 1—16. New York: Academic Press 1960.
- LINDNER, E.: Die submikroskopische Morphologie des Herzmuskels. *Z. Zellforsch.* **45**, 702—746 (1957).
- MOORE, D. H., and H. RUSKA: Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. *J. biophys. biochem. Cytol.* **3**, 261—268 (1957).
- NEEDHAM, D. M.: Biochemistry of muscular action. In: *The Structure and Function of Muscle, Vol. II*, pp. 55—104, Biochemistry and Physiology. New York: Academic Press 1960.
- POCHE, R., u. E. LINDNER: Untersuchungen zur Frage der Glanzstreifen des Herzmuskelgewebes beim Warmblüter und beim Kaltblüter. *Z. Zellforsch.* **43**, 104—120 (1955).
- ROTHSCHUH, K. E.: Beziehungen zwischen Struktur und Funktion an der Muskelfaser. IV. *Internat. Kongr. für Elektronenmikroskopie, Berlin 1958, Verhandlungen, Bd. II*, S. 290—301. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1960.
- RUSKA, C.: Die Zellstrukturen des Dünndarmepithels in ihrer Abhängigkeit von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit des Darminhalts. I. Wasser und Natriumchlorid. *Z. Zellforsch.* **52**, 748—777 (1960).
- Die Zellstrukturen des Dünndarmepithels in ihrer Abhängigkeit von der physikalisch-chemischen Beschaffenheit des Darminhalts. II. Wasserlösliche oberflächenaktive Substanzen. *Z. Zellforsch.* **53**, 867—878 (1961).
- RUSKA, H.: Elektronenmikroskopischer Beitrag zur Histologie des Skelettmuskels kleiner Säugetiere. *Z. Naturforsch.* **9b**, 358—371 (1954).
- The morphology of muscle fibers and muscle cells with different properties of conduction of excitation. *Exp. Cell Res., Suppl.* **5**, 560—567 (1958).
- Der Einfluß der Elektronenmikroskopie auf die biologische Forschung. *Marburger Sitzungsber.* **82**, 3—40 (1960).
- , and G. A. EDWARDS: A new cytoplasmic pattern in striated muscle fibers and its possible relation to growth. *Growth* **21**, 73—88 (1957).
- RYTER, A., et E. KELLENBERGER: L'inclusion au polyester pour l'ultramicrotomie. *J. ultrastruct. Res.* **2**, 200—214 (1958).
- SCHULZ, H.: *Submikroskopische Anatomie und Pathologie der Lunge*. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.
- SJÖSTRAND, F. S., and E. ANDERSSON: The ultrastructure of skeletal muscle myofilaments at various conditions of shortening. *Exp. Cell. Res.* **11**, 493—496 (1956).
- , and E. ANDERSSON-CEDERGREN: The ultrastructure of the skeletal muscle myofilaments at various states of shortening. *J. ultrastruct. Res.* **1**, 74—108 (1957).

- SPIRO, D.: The filamentous fine structure of striated muscle at different states of shortening. *Exp. Cell Res.* **10**, 562—565 (1956).
- THOENES, W., u. H. RUSKA: Über „leptomere Myofibrillen“ in der Herzmuskelzelle. *Z. Zellforsch.* **51**, 560—570 (1960).
- VALLEJO-FREIRE, A., e A. BRUNNER jr.: Eritrocitos na reticulocitose do saturnimo experimental. *Mem. Inst. Butantan* **28**, 245—266 (1957/58).
- VOGELL, W., F. R. BISHAI, TH. BÜCHER, M. KLINGENBERG, D. PETTE u. E. ZEBE: Über strukturelle und enzymatische Muster in Muskeln von *Locusta migratoria*. *Biochem. Z.* **332**, 81—117 (1959).
- ZEBE, E.: Die Muskeln der Insekten. *Umschau* **60**, 40—43 (1960).

Dr. H. HOFFMEISTER, Institut für Biophysik und Elektronenmikroskopie
der Medizinischen Akademie Düsseldorf, Moorenstr. 5

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargestellt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen“, Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung und Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzellige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.



Handbuch der allgemeinen Pathologie

Herausgegeben von Professor Dr. F. BÜCHNER, Freiburg i. Br. · Professor Dr. E. LETTERER, Tübingen · Professor Dr. F. ROULET, Basel

In zwölf Bänden

Im Sommer 1961 wird erscheinen :

Band V

Hilfsmechanismen des Stoffwechsels

In zwei Teilen — Redigiert von E. LETTERER

Erster Teil

Bearbeitet von zahlreichen Fachgelehrten

Mit etwa 326 Abbildungen. Etwa 1008 Seiten Gr.-8°. 1961.

(9 Beiträge in deutscher und 1 Beitrag in englischer Sprache)

Vorbestellpreis gültig bis zum Erscheinen Ganzleinen DM 268,—

Endgültiger Ladenpreis nach Erscheinen Ganzleinen DM 335,—

Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches gilt der Vorbestellpreis auch nach Erscheinen des Bandes weiter als Subskriptionspreis, jedoch ist jeder Band und Bandteil zum Ladenpreis einzeln käuflich

INHALTSÜBERSICHT

The normal physiology of the digestive system. By J. E. THOMAS, Loma Linda/Cal., USA, and M. H. F. FRIEDMAN, Philadelphia/Pa., USA · Die Pathologie der Verdauung und Resorption. Von E. JECKELN, Lübeck · Die parenterale Verdauung. Von H. HEINLEIN, Köln · Der Stofftransport. Von H. BENNHOLD und H. H. OTT, Tübingen · Physiologie der Atmung. Die Lungenbelüftung und der alveolare Gasaustausch. Von U. C. LUFT, Albuquerque/N.-Mex., USA · Die Atmungsregulation. Von W. SCHOEDEL, Göttingen · Pathologische Physiologie der Atmung. Von H. W. KNIPPING und W. BOLZ, Köln, unter Mitwirkung von H. VALENTIN und H. VENRATH, Köln · Die allgemeine Pathologie der äußeren Atmung. Von W. GIESE, Münster/Westf. · Die Orthologie und Pathologie der Kreislauffunktion. Von W. SCHOEDEL, Göttingen, und F. GROSSE-BROCKHOFF, Düsseldorf · Die allgemeine Pathologie des Blutkreislaufs. Von F. BÜCHNER, Freiburg i. Br. · Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG